

**KINETISCHE STUDIEN ZUR AUFLÄRUNG DES
SEKRETIIONSMECHANISMUS VON INSULIN
AM PERFUNDIERTEN RATTENPANKREAS**

RUDOLF RIEPL

1985

*Diss
München*

AUS DER MEDIZINISCHEN KLINIK INNENSTADT DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

DIREKTOR: PROF. DR. E. BUCHBORN

KINETISCHE STUDIEN ZUR AUFKLÄRUNG DES SEKRETIONSMECHANISMUS VON
INSULIN AM PERFUNDIERTEN RATTENPANKREAS

INAUGURAL - DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE IN DER GESAMTEN MEDIZIN

AN DER LUDWIG MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

VORGELEGT VON

RUDOLF RIEPL

AUS

HOERLKOFEN

1985

MIT GENEHMIGUNG DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. R. LANDGRAF
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. E. Buchborn
Dekan:	Prof. Dr. med. W. SPANN
Tag der mündlichen Prüfung:	25. Juli 1985

MEINEN ELTERN

INHALT

Kapitel		Seite
1.	<u>EINLEITUNG</u>	1
	<u>Ziele dieser Arbeit:</u>	11
	- Einfluß von Prostaglandinpräkursoren, Äthanol, Kalzium, Theophyllin und D 600 auf die Insulinausschüttung	
	- Qualitativer Stabilitätsnachweis der Prostaglandinpräkursoren	
2.	<u>METHODIK</u>	13
2.1	<u>Experimenteller Aufbau</u>	13
2.1.1	Präparationsplatz	13
2.1.2	Perfusionskammer	13
2.2	<u>Herstellung der Lösungen für die Perfusionen</u>	15
2.2.1	Stammlösungen	15
2.2.1.1	Dextran	15
2.2.1.2	Puffer	15
2.2.1.3	Glucose	16
2.2.1.4	Prostaglandinpräkursoren	16
2.2.1.5	D 600-Lösung	16
2.2.2	Perfusionslösungen	17
2.2.2.1	Kontrolllösung	17
2.2.2.2	Stimulationslösung	17
2.2.2.3	Kontroll- und Stimulationslösung mit Äthanol	18
2.2.2.4	Kontroll- und Stimulationslösung mit Theophyllin	18

Kapitel		Seite
2.2.2.5	Kontroll- und Stimulationslösung mit Theophyllin und D 600	18
2.2.2.6	Temperatur, pH, pO_2 , pCO_2	18
2.2.2.7	Aufnahme der Prostaglandinvorstufen in die Perfusorspritze	19
2.3	<u>Tierspezies und deren Ernährungsbedingungen</u>	20
2.4	<u>Pankreaspräparation und Isolierung</u>	20
2.4.1	Narkotisierung	20
2.4.2	Operationstechnik	20
2.4.3	Isolierung und Einbringung in die Perfusionskammer	22
2.5	<u>Perfusion des Pankreas</u>	22
2.5.1	Perfusionsdruckmessung	22
2.5.2	Flowbestimmung	22
2.5.3	Bestimmung von pH, pO_2 , pCO_2	23
2.6	<u>Probenentnahme und Umschalten</u>	23
2.6.1	Vorbereitung der Eppendorf-Gefäße	23
2.6.2	Auffangen der Proben	23
2.6.3	Lagerung der Proben	24
2.7	<u>Insulinbestimmung (RIA)</u>	24
2.7.1	Verfahrensprinzip	24
2.7.2	RIA-Reagentien	25
2.7.2.1	Insulinstandards	25
2.7.2.1.1	Ratteninsulinstandard	25
2.7.2.1.2	Humaninsulinstandard	26
2.7.2.1.3	Interne Kontrollstandards	26
2.7.2.2	Tracer	27
2.7.2.3	Doppelantikörper	27

Kapitel		Seite
2.7.3	Inkubations- und Pipettierschema	28
2.7.4	Filtration	28
2.7.5	Aktivitätsmessung	29
2.7.6	Berechnung der Sekretionsraten	29
2.8	<u>Qualitative und semiquantitative Bestimmungs-</u> <u>methode des Konzentrationsverlaufes und der</u> <u>Stabilität von Testsubstanzen</u>	29
2.8.1	Radioisotopen-markierte Testsubstanzen	29
2.8.2	Lösungsbereitung und Probenentnahme	29
2.8.3	Messung des Aktivitätsverlaufes	31
2.8.4	Qualitatives Nachweisverfahren mit der Dünnschichtchromatographie	32
2.8.4.1	Extraktionsverfahren	32
2.8.4.2	Auftragung und Trennung auf "Thin Layer Chromatography" - Platte	33
2.8.4.3	Messung im "Thin Layer Chromatography"-Scanner	33
2.9	<u>Auswertung der Ergebnisse und Statistik</u>	34
3.	<u>ERGEBNISSE</u>	35
3.1	<u>Aktivitätsverlaufskurven von (1-¹⁴C)-Arachidonsäure und 8,11,14-(1-¹⁴C)-Eicosatriensäure</u>	35
3.2	Chemische Stabilität der Prostaglandinvorstufen während der Experimente	37
3.2.1	Qualitativ	37

Kapitel		Seite
3.2.2	Semiquantitativ	37
3.3	<u>Perfusionen mit Prostaglandinvorstufen</u>	43
3.3.1	8,11,14 Eicosatriensäure, 11,14,17 Eicosatrien- säure, Arachidonsäure und 5,8,11,14,17 Eicosa- pentaensäure in Kontrollösung	43
3.3.2	8,11,14 Eicosatriensäure, 11,14,17 Eicosatrien- säure, Arachidonsäure und 5,8,11,14,17 Eicosa- pentaensäure in Stimulationslösung	46
3.4	<u>Perfusionen mit Äthanol</u>	51
3.4.1	Einfluß von Äthanol auf die basale Insulinse- kretion	51
3.4.2	Einfluß von Äthanol auf die Glucose- induzierte Insulinsekretion	52
3.5	<u>Perfusionen mit unterschiedlichen Konzentra- tionen von Kalzium, Theophyllin und D 600 in verschiedenen Kombinationen miteinander</u>	53
3.5.1	Der Einfluß von Theophyllin auf die Glucose- stimulierte Insulinsekretion	53
3.5.2	Der Einfluß der Änderung der extrazellulären Kalziumkonzentration auf die Sekretionswirkung von 20 mM Glucose und 5 mM Theophyllin	60
3.5.3	Der Einfluß von D 600 auf die mit Glucose und Theophyllin induzierte Insulinfreisetzung	64
4.	<u>DISKUSSION</u>	67
4.1	<u>Prostaglandinvorstufen</u>	67
4.2	<u>Äthanol</u>	70

Kapitel		Seite
4.3	<u>Theophyllin</u>	72
4.3.1	Der Theophyllineinfluß bei 2,5 mM Ca^{++}	73
4.3.2	Der Theophyllineinfluß bei 0,5 mM und 5 mM Ca^{++}	78
4.4	<u>D 600</u>	82
4.5	<u>Schlußfolgerungen aus den Punkten 4.1. bis 4.4</u>	83
5.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	86
6.	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	88
7.	<u>LEBENS LAUF</u>	118

Verzeichnis der Abbildungen:

Abbildung:	Seite
Abb. 1	Schematische Darstellung der Phasen der Glucose-induzierten Insulinsekretion 2
Abb. 2	Strukturformeln der Prostaglandinpräkursoren 7
Abb. 3	Schematische Darstellung der Stoffwechselwege von Arachidonsäure 8
Abb. 4	Schematische Darstellung der Perfusionskammer 13
Abb. 5	Schematische Darstellung der Probenentnahmepunkte für die Dünnschichtchromatographie 30
Abb. 6	Aktivitätsverlaufskurve von (1- ¹⁴ C)-Arachidonsäure 36
Abb. 7	Aktivitätsverlaufskurve von 8,11,14 (1- ¹⁴ C)-Eicosatriensäure 36
Abb. 8-10	TLC - Scanns von (1- ¹⁴ C)-Arachidonsäure 38-40
Abb. 11-12	TLC - Scanns von 8,11,14-(1- ¹⁴ C)-Eicosatriensäure 41-42
Abb. 13	Der Einfluß von 10 ⁻⁵ M 8,11,14 Eicosatriensäure auf die basale Insulinsekretion 43
Abb. 14	Der Einfluß von 10 ⁻⁵ M 11,14,17 Eicosatriensäure auf die basale Insulinsekretion 44
Abb. 15	Der Einfluß von 10 ⁻⁵ M Arachidonsäure auf die basale Insulinsekretion 44
Abb. 16	Der Einfluß von 10 ⁻⁵ M 5,8,11,14,17 Eicosapentaensäure auf die basale Insulinsekretion 45

Abbildung:	Seite
Abb. 17	Perfusion mit 20 mM Glucose über 40 Minuten 46
Abb. 18	Vorperfusion mit 20 mM Glucose und der Einfluß von 10^{-5} M 8,11,14 Eicosatriensäure auf die zweite Phase der Glucose-induzierten Insulinsekretion 47
Abb. 19	Vorperfusion mit 20 mM Glucose und der Einfluß von 10^{-5} M 11,14,17 Eicosatriensäure auf die zweite Phase der Glucose-induzierten Insulinsekretion 48
Abb. 20	Vorperfusion mit 20 mM Glucose und der Einfluß von 10^{-5} M Arachidonsäure auf die zweite Phase der Glucose-induzierten Insulinsekretion 48
Abb. 21	Vorperfusion mit 20 mM Glucose und der Einfluß von 10^{-5} M 5,8,11,14,17 Eicosapentaensäure auf die zweite Phase der Glucose-induzierten Insulinsekretion 49
Abb. 22	Der Einfluß von 0,1 Vol. % Äthanol auf die basale Insulinsekretion 51
Abb. 23	Der Einfluß von 0,05 Vol. % Äthanol auf die erste und zweite Phase der mit 20 mM Glucose induzierten Insulinsekretion 52
Abb. 24 a-c	Der Einfluß der Vorperfusion mit 5 mM Theophyllin auf die Glucose-induzierte Insulinfreisetzung bei niedrigem, normalem und hohem Kalzium. Die untere Kurve in der Abb. 24b zeigt das bei 2,5 mM Ca^{++} durch Glucose allein hervorgerufene Sekretionsprofil. 54
Abb. 25 a-c	Vorperfusion mit 20 mM Glucose und der Einfluß von 2 mM, 5 mM und 10 mM Theophyllin auf die zweite Phase der Glucoseinduzierten Insulinsekretion 58

Abbildung:	Seite
Abb. 26 a-b Vorperfusion mit 20 mM Glucose und der Einfluß von 0,5 mM Ca^{++} und 5 mM Ca^{++} auf die zweite Phase der Glucose-induzierten Insulinsekretion bei Anwesenheit von 5 mM Theophyllin	61
Abb. 27 a-c Vorperfusion mit 20 mM Glucose und der Einfluß von 0,8, 4 oder 8 μM D 600 allein auf die zweite Phase der Glucose-induzierten Insulinsekretion; respektive desgleichen bei zusätzlicher Anwesenheit von 10 mM Theophyllin	63
Abb. 28 Der Einfluß von 4 μM D 600 auf die zweite Phase der mit 20 mM Glucose und 5 mM Theophyllin stimulierten Insulinsekretion	65
Abb. 29 Schematische Darstellung des hypothetischen, qualitativen, cytosolischen Kalziumkonzentrationsverlaufes in den B-Zellen der Langerhansschen Inseln in Beziehung zu den Phasen der Insulinsekretion	84

Verzeichnis der Tabellen:

Tabelle:	Seite:
Tab. 1 Vergleiche von Flächenintegralen aus den Experimenten mit Prostaglandinpräkursoren	50
Tab. 2 Vergleiche von Flächenintegralen der Experimente in der Abbildung 24 a-c	55
Tab. 3 Vergleiche von Flächenintegralen der Experimente in der Abbildung 25 a-c	59
Tab. 4 Vergleiche von Flächenintegralen der Experimente in den Abbildungen 25 b und 26 a,b	62
Tab. 5 Vergleiche von Flächenintegralen der Experimente in den Abbildungen 25 c und 27 a-c	66

1. EINLEITUNG

Diabetes mellitus - die Feststellung dieser Diagnose ist nicht immer gleichbedeutend mit dem Tod der Mehrzahl der B-Zellen in den Langerhansschen Inseln des Pankreas.

Ein absoluter Insulinmangel ist kennzeichnend für den juvenilen Diabetiker (Typ I Diabetes), wogegen ein relativer Insulinmangel durch inadäquate Ausschüttungsmengen auf einen Sekretionsreiz, Insulinrezeptorenstörungen und/oder Postrezeptordefekte als Ursachen des sogenannten Altersdiabetes (Typ II Diabetes) angesehen werden (131). Aus dem Verständnis der physiologischen Triggermechanismen lassen sich verschiedene Gründe für die (Teil-) Hemmung der Insulinsekretion ableiten. Eine zentrale Rolle spielen dabei das Kalziumion und die Prostaglandinderivate.

Kohlenhydrate und Insulinsekretion

Nur metabolisierbare und das ATP-Niveau erhaltende Kohlenhydrate (6), (85), (87), (101), (158), (170), (198), (199), (200) und daraus ableitbare Aminosäuren (158), (198) provozieren bei alleiniger Einwirkung auf die B-Zellen der Langerhansschen Inseln eine charakteristische Insulinausschüttung. Das wichtigste Kohlenhydrat ist die D-Glucose, was sich mit ihrer Bedeutung in vivo verbinden läßt.

Bei der hier gewählten Versuchsanordnung (siehe Kapitel 2) wird das isolierte Rattenpankreas von einer künstlichen Blutersatzlösung durchströmt, die in Bezug auf den onkotischen Druck, die Osmolarität, das pH und die Ionenzusammensetzung dem physiologischen Medium weitestgehend entspricht. Nach 15 Minuten Vorperfusion mit sicher substimulatorischen 3mM Glucose (50) (=Kontrollphase) löst 20mM Glucose eine biphasische Kinetik der Insulinsekretion (36), (99) aus, wobei die schnelle erste Phase durch einen kurzdauernden Peak (=Initialphase I = ca. 5 Min.) und die nachfolgende zweite Phase (= Sekundärphase S) durch einen langsamen Anstieg von einem Tiefpunkt bis in etwa auf Peakhöhe gekennzeichnet ist (28), (198).

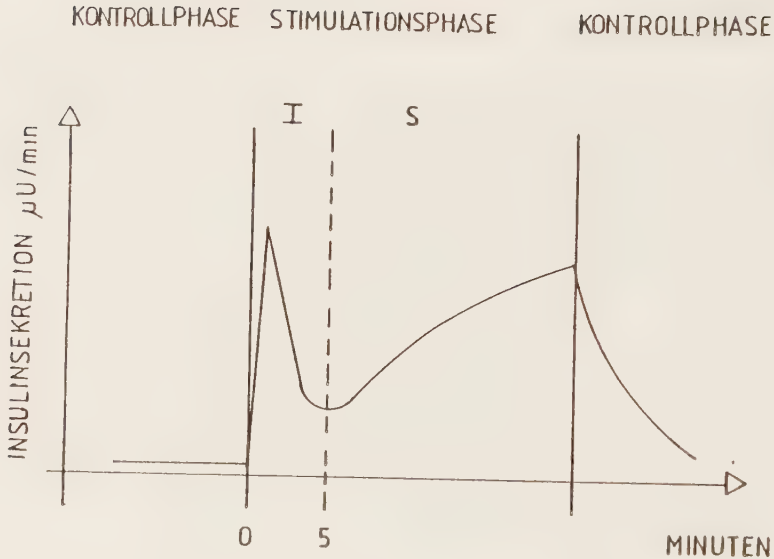


Abb. 1: Schematische Darstellung der Phasen der Glucose-induzierten Insulinsekretion (S= Sekundärphase, I = Initialphase)

Die vorgegebene Versuchsanordnung erfaßt die zeitliche Abfolge der Größe der Insulinfreisetzung und nicht die elektrophysiologischen, biochemisch-metabolischen Vorgänge und morphologischen Veränderungen in den B-Zellen (42).

Vorangestellt sei deshalb zunächst eine zusammenfassende Beschreibung der gegenwärtigen Kenntnisse des Mechanismus der Glucose-stimulierten Insulinsekretion, die im wesentlichen eine Verbindung (6), (28), (198) der Membran-(Cytosol-)Glucoserezeptor (101), (127) mit der Glucoseverstoffwechselungs-(Brennstoff-)Theorie (6), (51), (119), (120) beinhaltet. Der D-Glucosespiegel in der B-Zelle gleicht sich augenblicklich der extrazellulären Konzentration an (64), (66), (121), (126). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt zur Einschleusung des Glucosemoleküls in die Glykolyse ist die Phosphorylierung zu

Glucose-6-Phosphat mittels spezieller Glucokinasen und der üblichen Hexokinase (130) und nicht der Transport in die Zelle (6), (57).

Die Glucokinase transformiert sozusagen die extrazelluläre Glucosekonzentration in eine erhöhte Glykolyseaktivität und stellt somit ein mögliches Erkennungssystem für Glucose in den B-Zellen dar (130).

Substratmetabolismus und transmembranöse Ionenverschiebungen

Unmittelbar nach der Glucoseapplikation steigen die Konzentrationen der reduzierten Pyridinnucleotide und der H^+ -Ionen, die aus der Glycolyse und zu einem geringen Anteil (8), (57) aus dem Pentosephosphat-Shunt stammen, an (142), (163).

Das NAD(P)H und das H^+ -Ion als potente Auslöser einer Insulinsekretion (186) sind zwei entscheidende Kopplungsfaktoren (117), (162) zwischen Substratmetabolismus und darauf folgenden intraextrazellulären Elektrolytverschiebungen (23), (72), (120), (140), (161).

Die gesteigerte intrazelluläre Erzeugung von H^+ -Ionen durch Glucose, die nach außen als Nettoausstoß von H^+ -Ionen imponiert (117), (141), kann den mittels natürlicher Ionophoren erleichterten K^+ - und Ca^{++} -Efflux als Folge einer H^+ -Ionen-Blockade der Ca^{++} -Ionophoren resultieren (120).

Der Vergleich der (Glucose-)Dosis-Antwort-Kurve für den H^+ -Efflux einerseits, mit der initialen Hemmung des Ca^{++} -Efflux (= erste Phase) (95), (114), (124) und der vorübergehenden, reversiblen Abnahme des K^+ -Efflux (69) andererseits, läßt eine Ursache-Wirkungs-Beziehung wahrscheinlich erscheinen (117), (120).

Die Glucose-induzierte, erniedrigte K^+ -Permeabilität bedingt eine Depolarisation der B-Zellmembran (6), (69), (71), (76), die in Form von Aktionspotentialen registrierbar ist (33), (141). Die Membrandepolarisation reaktiviert die Leitfähigkeit der potentialabhängigen Ca^{++} -Kanäle (5), (6), (74) und ruft

initial einen Ca^{++} -Influx (25), (69), (114) hervor, der nach 3 - 4 Minuten trotz persistierender initialer Effluxhemmung von einem wiedererstarteten Ca^{++} -Efflux (= zweite Phase) (80), (95), (113) überdeckt wird.

Dieser Ca^{++} -Effluxanstieg rekrutiert sich zum einen Teil aus einem $\text{Ca}^{++}/\text{Ca}^{++}$ -Austauschprozess (116), (120), in dem einströmendes Kalzium intrazellulär gebundenes ersetzt (4), (77), und zum anderen Teil folgt er der Insulinfreisetzung (79), d.h. er scheint mehr eine Folge als eine Ursache der Stimulus-Sekretions-Koppelung zu sein (96).

Verteilung und Regulationsvorgänge des intrazellulären Ca^{++}

Die durch verschiedenartige, depolarisierend wirkenden Maßnahmen (5), (68), (74), (107) verursachte $^{45}\text{Ca}^{++}$ -Nettoaufnahme (61), (78), (97), (148), (194) führt zu einer kritischen Erhöhung des cytosolisch freien, ionisierten Kalziums (6), (190), das ursächlich für die Auslösung der Insulinausschüttung ist (160), (192) und diese im Verhältnis zum Ca^{++} -Gehalt des Cytosols steigert (122).

Um eine inadäquate Sekretion zu verhindern, nimmt HEDESKOV (57) ab einer gewissen Höhe des cytosolischen Ca^{++} -Spiegels das Inkrafttreten von "feed-back"-Kontrollmechanismen an. Eine große Rolle für die cytoplasmatische Ca^{++} -Erhöhung spielen ein gesteigerter intra-extrazellulärer Umsatz (194), wobei der Kalziumgesamtgehalt der Inseln konstant bleibt (4), (11), (193), (195) und intrazelluläre Umverteilungsvorgänge (110) der verschiedenen Glucose-empfindlichen Ca^{++} -Kompartimente (67), (122), (139). Zum einen gibt es den oberflächlichen, schnell mobilisierbaren Ca^{++} -Pool, submembranös oder in der Plasmamembran der B-Zellen gelegen, der für die akute Phase der Insulinsekretion notwendig oder sogar deren Ursache (62) ist, und zum anderen für die zweite Phase einen schwer mobilisierbaren Ca^{++} -Pool in den subzellulären Strukturen (15), (45), (60), (100), (110). Dennoch ist die Verfügbarkeit von extrazellulärem Ca^{++} unbedingt erforderlich für die erste Phase der Glucose-induzierten

Insulinsekretion, weniger für die zweite, die hauptsächlich von cAMP-vermittelter Umverteilung des intrazellulären Kalziums von den Zellorganellen ins Cytosol gesteuert wird (70), (167). Ohne jegliches extrazelluläres Ca^{++} wird kein Insulin freigesetzt (37), (137).

Calmodulin, cAMP und der Exocytoseprozeß

Calmodulin, ein Ca^{++} -abhängiges (182) und durch erhöhte cytosolische Ca^{++} -Konzentration aktivierbares (122), (183) Regulatorprotein konnte in hohen Konzentrationen in Rattenpankreasinseln nachgewiesen und dargestellt werden (166), (172), (179, Übersicht).

Es stimuliert die membranständige Adenylat-Cyclase (83), (179) zur Bildung von cAMP (29), (166), (182), welches im Gesamtprozeß der Insulinsekretion mehr die Rolle eines Verstärkers (122) und/oder Potentiators (53), (58), (88), (120), (166), (182) spielt und demnach erst nach der Erhöhung der Ca^{++} -Konzentration im Cytosol (49), (166) via Calmodulin-abhängiger Adenylat-Cyclase reguliert wird (74), (122).

Das cAMP und Ca^{++} -Calmodulin aktivieren auf voneinander getrennten Wegen (159), (179) die jeweils davon abhängige Proteinkinase, die durch Phosphorylierungen im mikrotubulären-mikrofilamentösen System (46), der Zellmembran (172) und der Sekretgranula (174) deren Eigenschaften so ändert, daß das Insulin der Sekretgranula durch Exocytose in das Interstitium freigesetzt wird (6), (47).

Das Insulin der ersten Phase stammt aus Granula, die sehr nahe der Zellwand-Plasmamembran-Einheit gelagert sind, im Gegensatz zu denjenigen für die zweite Phase, die erst entlang von Mikrotubuli vom Ort der Synthese zu dem der Exocytose wandern müssen (123). Der Exocytoseprozeß ist von ausgeprägten Veränderungen in der Phospholipidzusammensetzung der B-Zellmembran begleitet, denen eine Rolle bei der Kontrolle der Insulinfreisetzungsrates zukommen könnte (138), (s.a. unten).

Eine weitere Wirkung des cAMP ist die Hemmung der Ca^{++} -abhängigen ATPase (44), (82), (160), welche Kalzium vom Cytosol in die Zellorganellen, vor allem Mitochondrien (44), (53), (171) befördert, wodurch die Konzentration an ionisiertem Ca^{++} im Cytosol erhöht wird (19), (160), (167), (171), (175).

Der letztere Effekt könnte aber auch durch Freisetzung von Mitochondrien-gebundenem (19) oder aus Sekretgranula stammendem (53), (193) Kalzium erreicht werden.

cAMP scheint ein Hauptfaktor in der Regelung der Ca^{++} -Konzentration im Cytosol und in den Zellorganellen (19), (115), (122) zu sein, obwohl ohne die Glucose-bedingte Hemmung des Ca^{++} -Efflux kein ausreichender Anstieg über eine kritische Schwellenkonzentration für die Sekretionsauslösung zu erreichen ist (18), (165).

Eine intrazellulär partikelgebundene mit niedriger K_M und eine gelöste Phosphodiesterase mit hoher K_M inaktivieren cAMP zu 5'AMP (165).

Prostaglandinderivate und Insulinsekretion

Nicht abschließend geklärt ist, in welchem Ausmaß und an welchen Punkten der Stimulus-Sekretions-Koppelung letztendlich die Folgeprodukte der langkettigen, hochungesättigten Fettsäuren beteiligt sind.

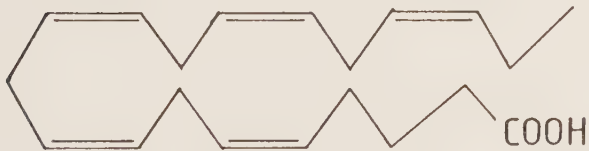
Die Erstbeschreibung der Strukturformeln der all cis-8,11,14-Eicosatrien- (=Homo- γ -linolensäure), der all cis-5,8,11,14-Eicosatetraen- (=Arachidonsäure) und der all cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaensäure als Präkursoren der entsprechenden Prostaglandine E_1 , E_2 , E_3 geht auf BERGSTRÖM et al., 1964, (12) zurück.



all cis-8, 11, 14-Eicosatriensäure



all cis-5, 8, 11, 14-Eicosatetraensäure



all cis-5, 8, 11, 14, 17-Eicosapentaensäure

Abb. 2: Strukturformeln der Präkursoren (12), (13), (40)

Für die Arachidonsäure (= AA) konnten METZ et al. (136) in den endokrinen Inselzellen zwei mögliche weiterführende Stoffwechselwege nachweisen, deren erster via Cyclooxygenase bis zu den diversen Prostaglandinen (= PG) und Thromboxanen (= TX) (34), (56), (150), (156), (173) und deren zweiter via Lipoxygenase, neben vielen anderen zum hauptsächlichen Endprodukt 12-Hydroxyeicosatetraensäure (= 12-HETE) (135) führt (siehe Abb. 3).

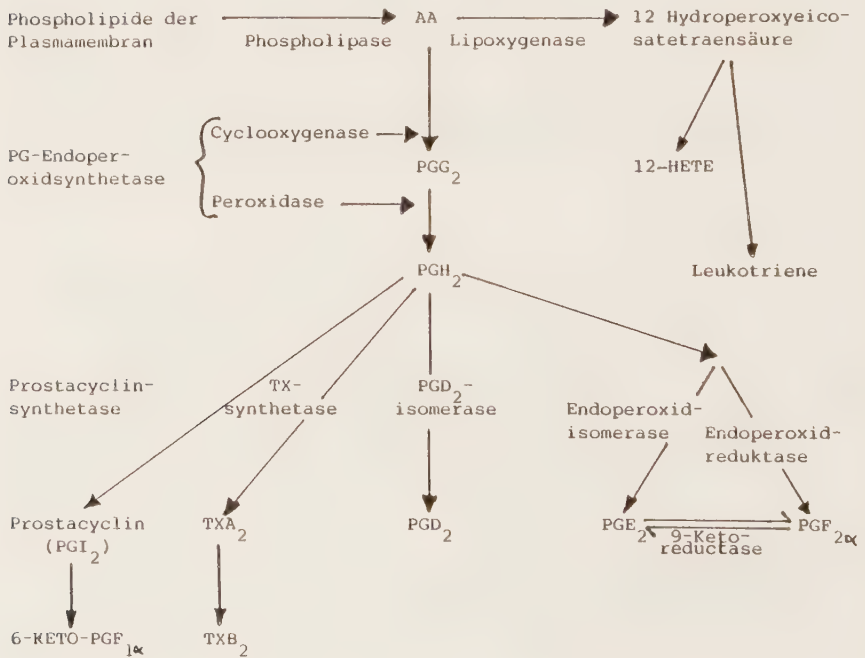


Abb. 3: Schematische Darstellung der Stoffwechselwege von Arachidonsäure

In Abhängigkeit von den gewählten Versuchsbedingungen beeinflussen die Prostaglandine der E- bzw. F-Serie die Insulinsekretion recht unterschiedlich. Es wird am isolierten, perfundierten Rattenpankreas bei Glucose-stimulierter Insulinsekretion sowohl eine Steigerung (2), (145), (144) als auch kein Effekt (102), (112) beobachtet.

Bei substimulatorischer Glucosekonzentration zeigt sich keine Wirkung (102), (157) oder z.T. nur ein geringer monophasischer Anstieg (102). Auch an isolierten Rattenpankreasinseln gewonnene Ergebnisse sind widersprüchlich (20), (89).

Die Wirkungsweise der Prostaglandine E_1 , E_2 und $F_{2\alpha}$ im Hinblick auf das elektrophysiologisch-biochemische Modell scheint z.T. in einer Beeinflussung des Membranpotentials, der Ca^{++} -Ionenströme (147) und in der Aktivitätssteigerung der Adenylat-Cyclase (89), (90) zu liegen.

LANDGRAF et al. (102) kommen zu dem Ergebnis, daß nicht so sehr die PG-Synthese, sondern die in Inseln vorhandene Aktivität der Phospholipase A_2 (106) in erster Linie in den Sekretionsprozeß eingeschaltet ist.

Bestätigt wird dies durch die Studien von YAMAMATO et al. (197) und KATO et al. (94) an isolierten Rattenpankreasinseln, in denen Glucose direkt oder indirekt die Membran-Phospholipase A_2 stimuliert und dadurch Arachidonsäure freisetzt, welche via Lipoxxygenase oder Cyclooxygenase metabolisiert wird.

Ebenso aktiviert Glucose dosisabhängig die Cyclooxygenase in Rattenpankreasinseln (31).

Phosphatidyl-inositol ist eine wahrscheinliche endogene Quelle für gewöhnlich in der 2er Position veresterte Arachidonsäure in Rattenpankreasinseln und es wird auch parallel zur zweiten Phase der Glucose-induzierten Insulinsekretion hydrolysiert (9), (32).

Die genannte Phosphatidyl-inositol-Hydrolyse benötigt die Anwesenheit von extrazellulärem Kalzium und ist offensichtlich Folge und nicht Ursache des initialen Ca^{++} -Influx (9).

Der erhöhte Umsatz von Phosphatidyl-inositol ist wohl z.T. auch Ca^{++} -Calmodulin-vermittelt, weil dieses in der Lage ist, die Phospholipase A_2 zu stimulieren (35).

Die mit der Glucose-induzierten Insulinsekretion parallel einhergehende Freisetzung endogener Arachidonsäure via Phospholipase A_2 (133) und deren Oxidation via Lipoxygenase (136) könnte eine Erklärung für das biphasische Sekretionsmuster bieten (133).

METZ et al. (133) leiten aus ihren Ergebnissen weiterhin ab, daß die Phospholipase A_2 die Rolle eines "Glucose-Fühlers" spielt und die Arachidonsäurefreisetzung in die Stimulus-Sekretions-Koppelung eingeschaltet ist (135). Die instabilen Folgeprodukte der Lipoxygenase (z.B. 12-Hydroperoxyeicosatetraensäure), welche die Glucose-induzierte Insulinfreisetzung stimulieren, wären dann im Sinne eines "Start-Signals" zu interpretieren und die Reduktion mittels reduzierender Äquivalente aus dem Glucosestoffwechsel zu den stabilen, aber wirkungslosen Endprodukten (z.B. 12-Hydroxyeicosatetraensäure), als "Stop-Signal" (135).

Die Lipoxygenase-Folgeprodukte erscheinen als die die Insulinsekretion vermittelnde "third messenger" (133).

Als antagonistisches System dazu führt der Metabolismus der Arachidonsäure via Cyclooxygenase zu einer Verminderung der Glucose-induzierten Insulinsekretion (136).

Zusammenfassend läßt sich konstatieren, daß metabolische Abläufe zur Erkennung der Glucose als Stimulus für die B-Zellen, Elektrolytverschiebungen (v.a. Ca^{++} -Erhöhung bis zu einer kritischen Grenze) zur Auslösung und das Mitwirken von mikrotubulären-mikrofilamentösen Prozessen in der Exocytose zur Aufrechterhaltung der Insulinsekretion notwendig sind (120).

Ziele der Arbeit

Die besondere Bedeutung des Glucosestoffwechsels, der Kalziumionenkonzentrationen, des "second messengers" cAMP sowie der Folgeprodukte der hochungesättigten Fettsäuren für die Mechanismen der Insulinsekretion ist nach dem aufgezeigten Modell evident.

Größtenteils wurden diese Erkenntnisse an statischen Inkubationssystemen mit isolierten, der mechanischen Alteration unmittelbar ausgesetzten Pankreasinseln oder Inselzellkulturen gewonnen. Daraus ergibt sich zum einen die Begründung für diese Arbeit, Stoffe zu testen, die Einfluß auf die oben genannten Hauptfaktoren des Sekretionsmechanismus ausüben und zum anderen ein Versuchssystem zu wählen, das der Dynamik der Insulinfreisetzung Rechnung trägt, Sequenzexperimente an einem isolierten Pankreas erlaubt und die Pankreasinseln selbst dabei unangestastet läßt.

Im Rahmen der biologischen Variabilität ist die mit 20 mM Glucose hervorgerufene Insulinsekretionskinetik (vgl. Abb. 1) konstant reproduzierbar (99).

Auf dieser Grundlage wird untersucht, ob durch die vorausgehende und/oder die mit Glucose simultanen Einwirkungen von Prostaglandinpräkursoren, Äthanol, Kalzium, Theophyllin und D 600 in jeweils unterschiedlichen Konzentrationen einen modifizierenden Einfluß auf ein durch konstante Glucosestimulation erreichtes "steady state" der Sekretion ausüben.

Die Gründe, die für die Verwendung von PG-Präkursoren sprechen, liegen zunächst in der großen Heterogenität der Prostaglandine selbst, die bei exogener Applikation, je nach Versuchsbedingungen, sehr gegensätzliche Reaktionen in Bezug auf die Insulinausschüttung hervorrufen (151) (s.a. oben).

Weiterhin handelt es sich um intrazelluläre Regulatoren (55) mit einem hohen Umsatz (184), weshalb in der Verwendung der

Vorstufen der physiologischeren Weg zu sehen ist, ihre Bedeutung im Sekretionsprozeß aufzuklären und die organeigenen Enzymsysteme zur Wirkung kommen zu lassen.

Außerdem hat sich die Verfügbarkeit an freien, hochungesättigten Fettsäuren in Form der Vorstufen (z.B. Arachidonsäure) als ein geschwindigkeitsbestimmender Schritt in der endogenen PG-Synthese herausgestellt (187).

Um die endogene Freisetzung der Präkursoren aus Phospholipiden und Triglyceriden (202) mittels Phospholipasen zu umgehen (185), werden die gemeinsamen Vorstufen der Prostaglandine und der Hydroxyfettsäuren dem Organ direkt angeboten.

Die Anfälligkeit der hochungesättigten Fettsäuren gegenüber Sauerstoff- und Lichteinflüssen macht die Überprüfung der chemischen Stabilität zum Zeitpunkt des Erreichens der Bauchspeicheldrüse und danach erforderlich.

Da die Präkursoren in absolutem Äthanol gelöst dem Perfusionsmedium zugemischt werden, muß untersucht werden, ob von diesem in der verwendeten Konzentration eine Wirkung auf die basale oder Glucose-induzierte Insulinsekretion ausgeht.

Aus Experimentserien von LANDGRAF et al. (103) geht hervor, daß der Phosphodiesterasehemmer Theophyllin auf die Leucin-stimulierte Insulinsekretion eher einen suppressiven Effekt ausübt. Somit ist ein weiteres Ziel, Aufschlüsse darüber zu erhalten, ob sich die Glucose-stimulierte Insulinfreisetzung unter Theophyllineinwirkung ähnlich verhält bzw. ob eine etwaige Hemmung zusätzlich eine Abhängigkeit von der extrazellulären Ca^{++} -Konzentration erkennen läßt. Die Bedeutung des extrazellulären Ca^{++} für den Sekretionsprozeß wird in den Experimenten mit D 600, einem Blocker von transmembranösen Ca^{++} -Kanälen, näher untersucht.

2. METHODIK

2.1 Experimenteller Aufbau

2.1.1 Präparationsplatz

Die Beschreibung erfolgt unter Punkt 2.4

2.1.2 Perfusionskammer

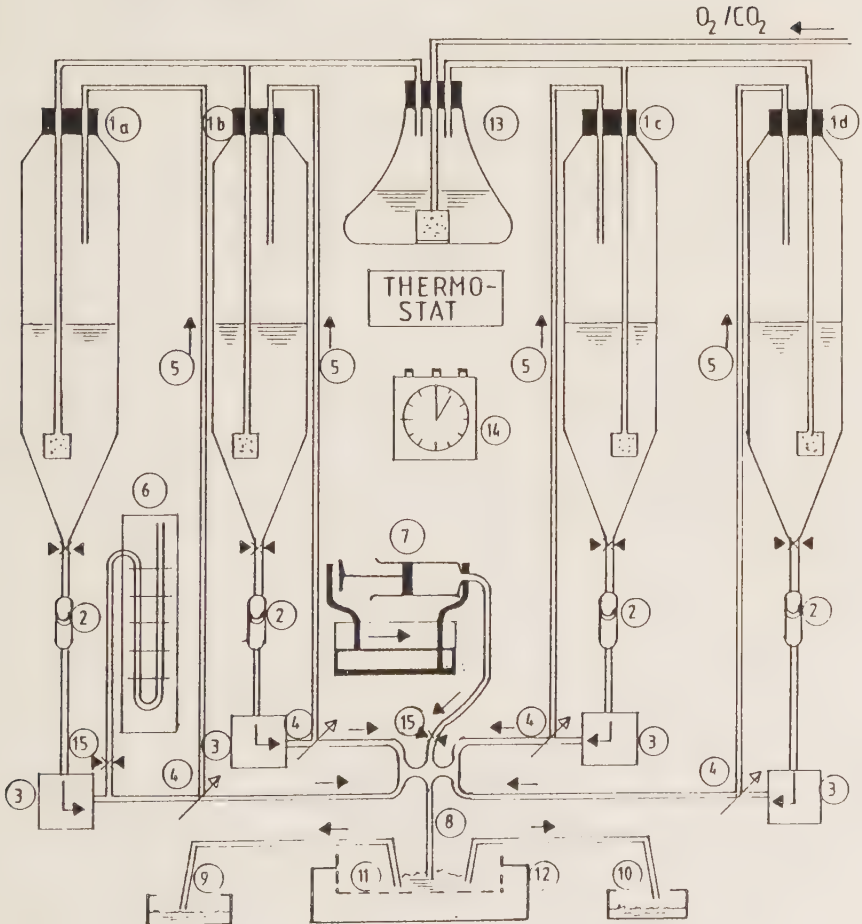


Abb. 4: Schematische Darstellung der Perfusionskammer

Zeichenerklärung zur Abbildung 4:

1 a-d = Glaskolben, die je nach Experiment mit verschiedenen Perfusionsflüssigkeiten (max. 700 ml) gefüllt werden, 2 = Filter, 3 = Schlauchpumpe, 4 = Dreiweghähne, 5 = Rücklauf, 6 = Quecksilbermanometer, 7 = Perfusor mit Spritze, 8 = Kanüle in der Art. coeliaca, 9 = Kanüle aus der Vena portae, 10 = Kanüle aus dem Duodenum, 11 = Organkomplex in der Metallschale im Wärmeblock = 12, 13 = Begasungssystem mit Befeuchtungsanlage 14 = Uhr, 15 = Absperrventile.

Die in der Abbildung 4 dargestellte Versuchsanordnung befindet sich in einer abgeschlossenen Plexiglaskammer, die nur eine kleine Öffnung zur Probeentnahme an der V. portae-Kanüle = 9 besitzt. Der Thermostat reguliert die Lufttemperatur auf 37°C. Die Glaskolben sind von einem Wassermantel umgeben (in der Abbildung nicht eingezeichnet), der von einem außerhalb der Kammer gelegenen Reservoir mit Wasser von 37°C versorgt wird, um die Perfusionlösungen auf dieser Temperatur zu halten. Ebenso wird der Wärmeblock = 12 durchspült.

Die Filter stammen von Bluttransfusionsbestecken. Im Gegensatz zu den Abbildungen werden die Silikonschläuche derart verlegt, daß eine Schlauchpumpe = 3 der Marke Ismatec (Typ MP 13GJ-4; SA/Zürich) ausreicht, die allseits gleiche Pumpendurchflußrate von 5 ml/min zu erzielen. Die Dreiweghähne = 4 erlauben direktes Umschalten vom Rücklauf = 5 auf Organperfusion durch die Kanüle in der Arteria coeliaca = 8. Diese Anordnung hat einen Totraum von ca. 0,5 ml. Je nach Experiment wird jeweils einer der Glaskolben = 1 a-d bzw. der Perfusor = 7 zu- und abgeschaltet. Der Perfusor von B. Braun Melsungen AG (Typ 71100) ist auf eine Fördermenge von 200 μ l/min eingestellt. Daraus ergibt sich mit der o.g. Pumpenflußrate ein Gesamtflow von 5,2 ml/min. Die Perfusionslösungen werden mit einem O₂/CO₂ Gasgemisch von 95 : 5 Vol% begast.

2.2 Herstellung der Lösungen für die Perfusionen

2.2.1 Stammlösungen

2.2.1.1 Dextran

Es werden 200 g Dextran 60 (Molekulargewicht: 60000 bis 80000) der Knoll AG, Ludwigshafen, in einen Glaskolben eingewogen, in 400 ml Aqua bidest gelöst und in ausgekochte Dialyseschläuche abgefüllt. Bei 4°C wird gegen einmal erneuertes Aqua bidest mindestens 12 Stunden dialysiert, um eventuell vorhandene niedermolekulare Verunreinigungen zu entfernen. Hochmolekulares Dextran wird von den Pankreasinseln nicht verstoffwechselt (101). Die Konzentration der bei 4°C aufbewahrten Stammlösung errechnet sich zu 200 g x 100/Volumen(ml).

2.2.1.2 Puffer

Die Salze (pro analysii) für die verschiedenen Pufferlösungen liefert die Firma Merck aus Darmstadt. Der Krebs-Henseleit-Bicarbonatpuffer wird als wässrige, zehnfach konzentrierte Stammlösung, getrennt nach seinen Komponenten (Puffer A₁₋₃ und Puffer B), hergestellt. Die Pufferstammlösungen lagern bei 4°C.

Puffer A ₁ :	NaCl	1197,8 mmol/l
	KCl	47,0 mmol/l
	CaCl ₂ x2H ₂ O	5,0 mmol/l
	MgSO ₄ x7H ₂ O	12,2 mmol/l

Puffer A ₂ :	NaCl	1197,8 mmol/l
	KCl	47,0 mmol/l
	CaCl ₂ x2H ₂ O	25,0 mmol/l
	MgSO ₄ x7H ₂ O	12,2 mmol/l

Puffer A ₃ :	NaCl	1197,8 mmol/l
	KCL	47,0 mmol/l
	CaCl ₂ ×2H ₂ O	
	MgSO ₄ ×7H ₂ O	12,2 mmol/l

Puffer B:	KH ₂ PO ₄	14,7 mmol/l
	NaHCO ₃	250,0 mmol/l

2.2.1.3 Glucose

Wasserfreie D(+) - Glucose von Merck, Darmstadt, wird zur Herstellung der 1 M (18,016 g/dl) Stammlösung verwendet. Diese lagert bei - 20°C.

2.2.1.4 Prostaglandinpräkursoren

Die Prostaglandinpräkursoren all cis-8,11,14-Eicosatriensäure (= Homo- γ -Linolensäure) von Sigma, St. Louis/USA, all cis-11, 14,17-Eicosatriensäure, Arachidonsäure (= all cis-5,8,11,14-Eicosatetraensäure) und all cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaensäure (als Methylester) von Serva Feinbiochemie, Heidelberg, werden in Ampulen zu je 50mg in öligem Form geliefert. Luftsauerstoff vermag diese hochungesättigten Fettsäuren leicht zu oxidieren, weshalb sie unter Stickstoffatmosphäre in n-Hexan (versetzt mit 10% Äthanol) gelöst werden. Diese so bei -80°C aufbewahrten Stocklösungen haben eine Konzentration von 10mg Fettsäure / ml Lösung.

2.2.1.5 D 600 Lösung

Bei der Knoll AG, Ludwigshafen, ist das α -Isopropyl - α ((N-methyl-N-homoveratril)- γ -aminopropyl) - 3,4,5 trimethoxyphenyl - acetonitril mit der Kurzbezeichnung D 600 in Form des Hydrochlorids mit dem Molekulargewicht von 521,1 g/mol erhältlich. Hiervon wird eine 1 mM Stammlösung zubereitet.

2.2.2 Perfusionslösungen

2.2.2.1 Kontrolllösung : 3 mM Glucose

Diese Glucosekonzentration ist sicher substimulatorisch, da die Sekretionsschwelle bei 4 mM anzusetzen ist (148), (198) und der physiologische Blutzuckerspiegel bei Ratten zwischen 4,4 mM und 6,6 mM schwankt.

Pro 100 ml werden benötigt: 8 g Dextran (8g/dl x 100 ml /
X g/dl Stammlsg.)

10 ml Puffer A₂

10 ml Puffer B

0,3 ml 1 M Glucose

Aqua bidest. ad 100

2.2.2.2 Stimulationslösung : 20 mM Glucose

Diese Glucosekonzentration erzeugt eine fast maximale Insulinfreisetzung, wie eigene Vorversuche und die Hinweise aus der Literatur ergeben.

Pro 100 ml werden benötigt: 8 g Dextran (s.o.)

10 ml Puffer A₁₋₃

10 ml Puffer B

2 ml 1 M Glucose

Aqua bidest. ad 100

Daraus errechnen sich folgende Ionenkonzentrationen für Kontroll- und Stimulationslösungen:

NaCl	119,78 mmol/l
KCl	4,7 mmol/l
CaCl ₂ x 2H ₂ O	2,5 mmol/l (aus Puffer A ₂)
	0,5 mmol/l (aus Puffer A ₁)
	5,0 mmol/l (aus Puffer A ₃)
MgSO ₄ x 7H ₂ O	1,22 mmol/l
NaHCO ₃	25,0 mmol/l
KH ₂ PO ₄	1,47 mmol/l

Die steigende Osmolarität durch die unter 2.2.2.3 bis 2.2.2.5 genannten Zusätze in den hier verwendeten Konzentrationen hat keinen Einfluß auf die Phasen der Insulinsekretion (111).

2.2.2.3 Kontroll- und Stimulationslösung mit Äthanol

Absoluter Äthanol von J.T. Baker Chemikalien, Groß-Gerau, wurde bei den entsprechenden Experimenten der Kontrolllösung in einer Menge von 0,1 Vol% bzw. der Stimulationslösung in einer Menge von 0,05 Vol% zugesetzt.

2.2.2.4 Kontroll- und Stimulationslösung mit Theophyllin

Theophyllin (Molekulargewicht: 180,17 g/mol) in fein pulverisierter Form von Schuchard, München, wird in die Lösungen eingewogen, um eine Konzentration von 2, 5 oder 10 mM zu erreichen.

2.2.2.5 Kontroll- und Stimulationslösung mit Theophyllin und D 600

Zu den unter 2.2.2.4 genannten Theophyllinkonzentrationen wird das entsprechende Volumen D 600 aus der 1mM Stammlösung pipettiert.

2.2.2.6 Temperatur, pH, pO_2 , pCO_2

Die fertigen Lösungen werden in die entsprechenden Perfusionskolben (= 1 a-d in Abb. 4) gefüllt, auf 37°C erwärmt und ca. 20 min mit einem O_2 : CO_2 -Gasgemisch von 95 : 5 v/v begast. Der pO_2 stellt sich zu ca. 350 mmHg und der pCO_2 zu ca. 30 mm Hg ein.

Schon geringe pH - Abweichungen können eine Stimulation bzw.

Suppression der Insulinsekretion zur Folge haben (86), (146). Deshalb wird mit Hilfe von 2 n HCl bzw. 2 n NaOH das pH auf 7,4 eingestellt.

2.2.2.7 Aufnahme der Prostaglandinvorstufen in die Perfusorspritze

Der in Eis gebetteten Prostaglandin-Stocklösung (10 mg/ml) wird unmittelbar vor Experimentbeginn das berechnete (s.u.) Volumen entnommen und in einem Eppendorfgeläß unter N_2 -Atmosphäre eingedampft, um schädigende Einflüsse des n-Hexans auf das Perfusionsorgan zu vermeiden.

Die Prostaglandinvorstufen werden in einem gleichen Volumen absoluten Äthanol wieder aufgenommen und davon wird die entsprechende Menge in die Perfusorspritze zu einem bestimmten Volumen Kontroll- bzw. Stimulationslösung (siehe unter 2.2.2.1) pipettiert. Es ist auf gute Durchmischung und Blasenfreiheit des Anschlußsystems zu achten.

Die Berechnung der benötigten Mengen bzw. Volumina wird am Beispiel der Arachidonsäure (Molekulargewicht 304,5 g/mol) ausgeführt. Unter Berücksichtigung der verschiedenen Molekulargewichte gilt das gleiche für die anderen Prostaglandinvorstufen. Bei Verwendung einer 50 ml Spritze liefert der Perfusor 200 μ l/min zu den 5 ml/min der Schlauchpumpe, d.h. bei einem Gesamtflow von 5,2 ml/min wird die Lösung aus dem Perfusor 1 : 26 verdünnt. Die gewünschte Konzentration an Prostaglandinpräkursoren nach der Zumischung beträgt 10^{-5} M (= 3045 μ g Arachidonsäure pro Liter). Unter Einbeziehung des Verdünnungsfaktors ergibt sich für die Arachidonsäure in der Perfusorspritze eine Konzentration von 79,19 mg/l.

Je 10 Minuten werden aus der Perfusorspritze 2 ml Lösung abgegeben, in der sich 158,34 μ g Arachidonsäure befinden. Dafür sind aus der Stocklösung (10 mg/ml) 15,83 μ l zu entnehmen und mit Kontroll- bzw. Stimulationslösung auf 2 ml zu ergänzen.

2.3 Tierspezies und deren Ernährungsbedingungen

Die männlichen SPF-Ratten, Sprague Dawley von Mus Rattus GmbH, Brunnthal bei München, wiegen bei Lieferung 250 - 300 g. Die Tiere wurden 10 - 14 Tage mit Altromin^R von Altromin-Spezialfutter GmbH, Lage/BRD, ad libitum ernährt, bis das Gewicht auf 300 - 350 g angestiegen war.

Am Vortag abends, 16-20 Stunden vor dem Experiment, werden die Ratten in einen Käfig mit grobmaschigem Drahtnetzboden zur Vorbeugung der Koprophagie zum Fasten gesetzt. Sie bekommen nur Wasser.

Die Versuchstiere befinden sich dadurch etwa in der gleichen Phase der tageszeitlichen Schwankungen der Insulinsekretion (10).

2.4 Pankreaspräparation und Isolierung

2.4.1 Narkotisierung

Den Versuchstieren werden 55 mg Pentobarbital (Nembutal^R) pro kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Die narkotisierende Wirkung tritt innerhalb von 5 bis 10 Minuten ein.

2.4.2 Operationstechnik

Die im folgenden beschriebene Operationstechnik entspricht leicht modifiziert einer Methode von SUSSMANN et al. (176) und GRODSKY et al. (51).

Ziel der Präparation ist es, das Pankreas mit der Milz, dem Magen und dem proximalen Teil des Duodenumms en bloc aus dem Oberbauch der Ratte zu entfernen, wobei vorher die Arteria coeliaca und die Pfortader mit einer Kanüle versehen werden. Alle anderen Gefäße werden unterbunden.

Das auf dem Rücken liegende, an den Beinen aufgespannte Versuchstier wird zum besseren Absaugen der leicht verschleimenden Atemwege zunächst tracheotomiert.

Der Situs wird mit einem Längsschnitt von der Regio publica bis

zum Processus xiphoideus eröffnet und durch einen Querschnitt nach links und rechts lumbal erweitert. Alle weiteren Angaben erfolgen aus der Sicht des Operateurs.

Durch Spaltung des Mesocolon descendens und ascendens, doppelter Ligatur (= Seide von MEZ : Proto Cord 50) der Arteriae colicae sinistrae und mediae wird der Dickdarm mobilisiert. Nun unterbindet und durchtrennt man den Mesenterialgefäßstiel knapp am Unterrand des Pankreas. Es schließt sich die Resektion des ischämischen Darmes an. Eine Kanüle im proximalen Duodenalstumpf gewährleistet den Abfluß von Magen- und Pankreassekret. Zwischendurch wird der Situs regelmäßig mit warmer physiologischer Kochsalzlösung befeuchtet. Nach der doppelten Unterbindung und Durchtrennung des Ösophagus präpariert es sich weiterhin leichter unter dem Mikroskop bei ca. 5-facher Vergrößerung. Man verschafft sich nun freien Zugang zur Art. hepatica propria, die distal von ihrem Ursprung aus der Art. hepatica communis zusammen mit dem Gallengang doppelt ligiert und durchtrennt wird. Jetzt präpariert man die Pfortader bis zu ihrer Aufzweigung am Leberhilus frei und legt eine Fadenschlinge für die spätere Kanülierung.

Zur Eröffnung des Retroperitoneums entlang der Aorta müssen Magen, Milz und Pankreas nach links verlagert werden. Distal des Abganges der Art. mesenterica superior wird die erste Schlinge um die Aorta, zwischen Art. mesenterica sup. und Art. coeliaca die zweite und proximal dieser die dritte gelegt. 500 I.E. Heparin in die Vena cava inferior injiziert verhindern die intravasale Gerinnung während der Ischämiezeit. Nun werden die Schlingen um die Aorta in der o.g. Reihenfolge zugezogen, und gegenüber dem Abgang der Art. coeliaca wird durch einen kleinen Schnitt eine Kanüle (Portex PP 50, Portex limited, Hythe Kent) 2 mm in die Art. coeliaca vorgeschoben und mit einer darumgelegten Schlinge fixiert. Sofort danach wird fertige Kontrolllösung mit 120 cm H₂O Druck infundiert. Die Ischämiedauer ist weniger als zwei Minuten.

Durch einen Schnitt in den linken Pfortaderast wird eine Kanüle (Portex PP 200) eingeführt und mit der gelegten Schlinge festgebunden.

2.4.3 Isolierung des Organkomplexes und Einbringung in die Perfusionskammer

Der behutsam mit den Fingern der linken Hand gefaßte Organkomplex wird en bloc herausgeschnitten und in der vorgewärmten Metallschale in den Wärmeblock der Perfusionskammer gebracht. Bis zum Anschluß an das Perfusionssystem in der Kammer tritt eine zweite Ischämie von 2 - 3 min auf. Der Organkomplex liegt in Kontrolllösung, so daß am Gewebe eine Temperatur von 36 - 37°C gewährleistet ist. Hypothermie senkt bzw. hemmt die Insulinsekretion (38), (57). Die Operation dauert insgesamt 50 min..

2.5 Perfusion des Pankreas

Wie schon aus dem Versuchsaufbau (Abb. 4) ersichtlich, handelt es sich um ein offenes System, in dem die durch den Organkomplex gepumpten Lösungen nicht mehr rezirkulieren. So kann eine mögliche Interaktion der vom Pankreas in den Pfortaderstrom sezernierten Substanzen (z.B. Glucagon, Somatostatin) und eine "feed-back" Hemmung durch bereits vorhandenes Insulin verhindert (3), (27) werden.

2.5.1 Perfusionsdruckmessung

Nach dem Öffnen des entsprechenden Absperrventils zeigt das Quecksilbermanometer (vgl. Abb. 4) bei verdrehungsfreier Lage der Kanülen einen ziemlich konstanten Druck von ca. 80 mm Hg an.

2.5.2 Flowbestimmung

Sowohl während der Kontroll- als auch der Stimulationsphase wird alle 5 min durch einminütiges Sammeln des Perfusates an der Vena portae-Kanüle ein Flow von ca. 5 ml/min gemessen. Falls die V. portae-Kanüle torquiert ist, fällt die Perfusionsrate durch ein eintretendes Stauungsödem rasch ab und der Druck steigt.

2.5.3 Bestimmung von pH, pO_2 , pCO_2

Mit Hilfe einer herkömmlichen Spritze werden aus der Vena portae-Kanüle einige ml Perfusat blasenfrei abgesaugt. Ein vollautomatisches Analysiergerät mißt einen pO_2 von ca. 133 mm Hg und einen pCO_2 von ca. 44 mmHG (vgl. die Werte in den Perfusionslösungen unter Punkt 2.2.2.6). Das pH des Pfortaderausflusses, gemessen mit einer Glaselektrode, schwankt zwischen 7,35 und 7,45.

2.6 Probeentnahme und Umschaltvorgang

2.6.1 Vorbereitung der Eppendorf-Gefäße

In jedes Proberöhrchen (1,5 ml) werden 50 μ l einer 20 g/dl enthaltenden Lösung von bovinem Serumalbumin (Behringwerke, Marburg), 50 μ l Trasylol^R (20000 KIE/ml von Bayer, Leverkusen) und 10 μ l einer 12 g%-igen EDTA-Lösung vorpipettiert. Der Zusatz von bovinem Serumalbumin verhindert die Adsorption von Insulin an Glas- und Plastikgefäße (26), (145).

Der Kallikreininhibitor Trasylol^R soll möglicherweise mitsezernierte Pankreasproteasen inaktivieren (119), um einer Spaltung von Insulin und Glucagon entgegenzuwirken (154). Trasylol^R hat keinen Einfluß auf den Insulin-RIA (99).

2.6.2 Auffangen der Proben

Nach dem Anschluß des Organkomplexes an die Art. coeliaca-Kanüle wird 15 Minuten lang mit Kontrolllösung perfundiert, wobei 300, 180, 60 und 15 Sekunden vor dem Umschalten auf die Stimulationsbedingung zum Zeitpunkt 0 für jeweils 13 Sek. das Perfusat (= 1,1 ml) in einem vorbereiteten Eppendorf-Gefäß aufgefangen wird.

Der Umschaltvorgang von einer zur anderen Lösung benötigt höchstens fünf Sekunden. Bei einem Totraum von ca. 500 μ l zwischen arteriellem Zufluß und venösem Abfluß ist nach dem Umschalten ein vollständiger Ersatz einer Lösung sicher binnen einer Minute anzunehmen.

Die aus Vorexperimenten gewonnenen Erkenntnisse über das zu erwartende Sekretionsprofil von Insulin bestimmen die Zeitpunkte der Probennahme nach einem Umschaltvorgang: In der ersten Minute alle 15 Sek., bis zur fünften Minute alle 30 Sek., bis zur achten Minute alle 60 Sek. und danach alle zwei, drei oder fünf Minuten. Die Länge der einzelnen Abschnitte in den Sequenzexperimenten ist aus den entsprechenden Abbildungen ersichtlich.

2.6.3 Lagerung der Proben

Die gewonnenen Proben werden bis zum Experimentende auf Eis gelagert und anschließend tiefgefroren bei -20°C aufbewahrt. Mehrmaliges Auftauen und Wiedereinfrieren ändert den Insulingehalt der Proben nicht (128).

2.7 Insulinbestimmung (RIA)

2.7.1 Verfahrensprinzip

Die Messung der Insulinkonzentration in den Proben erfolgt mit Hilfe des von HALES und RANDLE (54) entwickelten, auf der Doppelantikörpermethode basierenden Radio-Immuno-Assay (RIA). Insulin-Antikörper werden zunächst durch Anti-Insulin-Antikörper präzipitiert. Dieser Immunkomplex wird mit bekannten Insulinkonzentrationen (=Standards) und den Proben inkubiert, dann mit gleichen Mengen ^{125}J - markiertem Rinderinsulin versetzt und erneut inkubiert.

^{125}J - markiertes und nicht markiertes Insulin konkurrieren kompetitiv um die Bindungsstellen am Immunkomplex. Je mehr In-

sulin in den Proben bzw. Standards vorhanden ist, desto weniger ^{125}J -Rinderinsulin bindet sich. Nach der Abtrennung des sogenannten freien (= ungebundenen markierten und unmarkierten) Insulins ergibt die Radioaktivität im Präzipitat der Proben im Vergleich zu der der Standards die Absolutkonzentrationen an Insulin.

2.7.2 RIA-Reagentien

2.7.2.1 Insulinstandards

2.7.2.1.1 Ratteninsulinstandard

Dieser Standard wird bei den Experimenten mit Prostaglandinvorstufen und Äthanol (siehe Punkt 3.3 und 3.4) eingesetzt. 0,1 mg gefriergetrocknetes Ratteninsulin (21,4 U/mg) von der Firma Novo, Kopenhagen, (Lot Nr.: 791009) wird in 2ml Perfusionspuffer (Zusammensetzung s.u.) gelöst und zunächst in 20 μl Fraktionen portioniert. Eine dieser Fraktionen verdünnt man weiter mit 980 μl Perfusionspuffer. Eine wiederum daraus gewonnene 50 μl Fraktion stellt die Stocklösung für die Ausverdünnung zur Standardkurve mit den Punkten 6, 4, 3, 2, 1 und 0,4 ng Insulin pro ml dar.

Beim Auftreten höherer Insulinkonzentrationen außerhalb des Meßbereiches kann die Probe bis zu einem Faktor von 10 mit Perfusionspuffer verdünnt und an der o.g. Standardkurve abgelesen werden. Die ausreichende Genauigkeit für dieses Vorgehen stützt sich auf Versuche mit Verdünnungsreihen, in denen die um die Verdünnungsfaktoren (bis 10) korrigierten Werte einen Variationskoeffizienten von 7 bis 8 % aufweisen.

0,05 % und 0,1 % Äthanol in der Probe haben keinen Einfluß auf die Standardkurve. Alle Standards werden bei -20°C aufbewahrt.

Perfusionspuffer zum Verdünnen (pH = 7,4):

8 g%	Dextran
10 %	Puffer A ₂
10 %	Puffer B
0,83 g%	Bovines Serumalbumin
0,144 g%	EDTA
83200	K.I.E. Trasylol ^R pro 100 ml
Aqua bidest ad 100.	

2.7.2.1.2 Humaninsulinstandard

Dieser Standard wird bei den Versuchen mit Theophyllin, verschiedenen Ca^{++} -Konzentrationen und D 600 (vgl. Punkt 3.5) angewendet. Der Humaninsulinstandard (Lot 5727) von Wellcome Reagents Limited, Beckenham, England, wird in 2,6 ml Perfusionspuffer gelöst und in 200 μl Fraktionen auspipettiert. Davon wird eine mit 800 μl Perfusionspuffer (s.o.) vermischt, so daß eine Konzentration von 200 $\mu\text{U/ml}$ resultiert. Diese Stocklösung wird in mehreren Schritten zu den Konzentrationen 200 / 100 / 75 / 50 / 25 / 12,5 / 6,25 $\mu\text{U/ml}$ für die Standardkurve verdünnt.

Im Vergleich zu den mit Ratteninsulinstandard bestimmten Insulinproben liegen die an obiger Humanstandardkurve abgelesenen Werte um die Hälfte niedriger (99). Auch bei höherer Insulinkonzentration in den Proben ist deshalb eine Verdünnung bis zum Faktor vier ausreichend. Theophyllin beeinflusst den Insulin-RIA nicht (104).

2.7.2.1.3 Interne Kontrollstandards

Sie werden aus einem gepoolten Perfusat der Stimulationsphase eines Experiments gewonnen. In jeweils 200 μl Portionen wird ein Teil zunächst unverdünnt und ein weiterer 1 : 10 in Perfusionspuffer verdünnt auspipettiert und bei -20°C tiefgefroren. Unmittelbar vor einer Insulinbestimmung wird jeweils eine Portion aufgetaut und die noch unverdünnte 1 : 10 in Perfusionspuffer verdünnt bzw. die schon verdünnte unverändert in den Assay eingesetzt.

Sowohl bei den Ansätzen mit Ratten- als auch mit Humaninsulinstandard sind die Mittelwerte für die zunächst unverdünnt gelassenen Proben um 10,5 % bzw. 12,6 % niedriger. Eine Erklärung hierfür bietet möglicherweise die Adhäsion von Insulinmolekülen zu Oligomeren beim Lagern in höherer Konzentration und damit eine Nichterfassung bei der Bestimmung.

Als statistisches Maß für zufällige Fehler bei der Insulinbestimmung in den o.g. 200 μ l Fraktionen (= Kontrollstandards) dient der prozentuale Anteil der Standardabweichung vom Mittelwert (= Variationskoeffizient (VK)).

In den Ansätzen mit Ratteninsulinstandard läßt sich bei den schon verdünnten Proben ein VK von 20 % ermitteln. Mit Humaninsulinstandard bessert sich die Präzision zu einem VK von 10,2 % bei den schon bzw. zu einem VK von 11,4 % bei den kurz vor dem Ansatz verdünnten Proben.

2.7.2.2 Tracer

Es handelt sich um ^{125}J -Rinderinsulin (in: 1% bovinem Serumalbumin; 0,05 M Na_3PO_4 ; 0,1 % NaN_3 ; pH = 7,4) der Behringwerke AG, Marburg, mit einer spezifischen Aktivität von 140 - 170 mCi/mg und einer Gesamtaktivität von 11 - 13 μ Ci. Im Assay wird der Tracer 1 : 20 in Sorinpuffer verdünnt eingesetzt. Der Sorinpuffer enthält pro 100 ml: 1,06 mg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 100 mg bovines Serumalbumin, 372,5 mg EDTA und 200 mg humanes Albumin.

2.7.2.3 Doppelantikörper

Wellcome Reagents Ltd., Beckenham, England, liefert das gefriergetrocknete Bindungsreagenz (Lot 8552), das in 8 ml A.d. aufgelöst wird. Es ist ein Immunpräzipitat aus einem Insulin-Antikörper vom Meerschweinchen und einem gegen Meerschweinchenglobulin gerichteten Antikörper aus Kaninchenserum (= Doppelantikörper). Ohne Einbußen in der Bindungskapazität kann das Reagenz bei -20°C länger als eine Woche gelagert und dann wiederverwendet werden.

2.7.3 Inkubations- und Pipettierschema

Zuerst wird die Standardkurve auspipettiert, beginnend mit fünf sog. Nullstandards B_0 (= insulinfreier Perfusionspuffer), denen sich in ansteigender Konzentration Zweifachbestimmungen der 0.9 Insulinstandards anschließen. Die unspezifische Bindung von ^{125}J -Rinderinsulin ergibt sich aus drei Werten, wobei nur Perfusionspuffer ohne Antikörper eingesetzt wird. Dann folgen die Proben aus den Experimenten in Einfachbestimmung.

Die spezifische Bindung errechnet sich aus dem Quotienten der Mittelwerte von B_0 (in cpm = Radioaktivität in counts per minute). Sie liegt zwischen 45 % und 60 %. Die untere Nachweisgrenze ist als diejenige Insulinkonzentration definiert, die oberhalb der dreifachen Standardabweichung der Nullstandards B_0 liegt (128). Das folgende Pipettierschema spiegelt die von HALES und RANDLE (54) angegebenen Verhältnisse der Einzelkomponenten wieder.

50 μl Standard oder Probe
+
50 μl Doppelantikörper

Schütteln; 6 Stunden bei 4°C inkubieren
+
50 μl Tracer

Schütteln; 18 - 22 Stunden bei 4°C inkubieren

Filtration

Aktivitätsmessung

2.7.4 Filtration

Die Trennung des Immunkomplex - gebunden vom ungebundenen Insulin erfolgt mit Hilfe des halbautomatischen Filtrierverfahrens nach BOTTERMANN et al. (16). Dabei schlagen sich die Immunpräzipitate auf in physiologischer Kochsalzlösung getränkten Filterpapieren nieder.

2.7.5 Aktivitätsmessung

Von den nach dem o.g. Verfahren gewonnenen Filterpapieren wird die Radioaktivität in Impulsen pro Minute im β -Zähler (LKB Wallac 80000, Bromma, Schweden) bestimmt. Die Zählraten werden per Computer durch die von MARSCHNER et al. (125) entwickelte "spline-function" ausgewertet.

2.7.6 Berechnung der Sekretionsraten

Durch einen aus den Standards vorgegebenen Faktor lassen sich ng/ml in $\mu\text{U/ml}$ umrechnen. Unter Einbeziehung der Flowrate (ml/min) ermittelt man die für die späteren Betrachtungen besser geeigneten μU pro Minute.

2.8 Qualitative und semiquantitative Bestimmungsmethode des Konzentrationsverlaufes und der Stabilität von Testsubstanzen

2.8.1 Radioisotopenmarkierte Testsubstanzen

Die 8,11,14-(1- ^{14}C)-Eicosatriensäure ($1,76 \times 10^{-3} \text{ M}$) mit einer spezifischen Aktivität von 57,0 mCi/mmol und die (1- ^{14}C)-Arachidonsäure ($1,8 \times 10^{-3} \text{ M}$) liefert New England Nuclear, 549 Albany St., Boston, Mass.. Die radiochemische Reinheit ist größer als 98 %, mit 99 % cis- und 1 % trans-Isomeren. Beide in absolutem Äthanol gelösten Säuren lagern bei -80°C in einer Stickstoffatmosphäre unter Lichtausschluß.

2.8.2 Lösungsbereitung und Probenentnahme

Bei allen Experimenten mit radioaktiven Testsubstanzen wird nur Kontrolllösung verwendet. Wie unter 2.2.2.7 beschrieben, füllt man die Perfusorspritze mit unmarkierter 8,11,14-Eicosatriensäure bzw. Arachidonsäure, so daß nach der 1 : 26 Zumischung die Endkonzentration von 10^{-5} M erzielt wird.

Zusätzlich gibt man die markierten Säuren in die Perfusorspritze. Für dieses Vorhaben wird von der 8,11,14-(1- ^{14}C)-Eicosatriensäure- und der (1- ^{14}C)-Arachidonsäure-Stocklösung eine

1 : 10 Verdünnung in absolutem Äthanol hergestellt, um handlichere Pipettiervolumina zu bekommen. Entsprechend dem unter Punkt 2.2.2.7 genannten Rechenbeispiel für nicht radioaktive Arachidonsäure versetzt man je 2 ml Lösung in der Perfusions-spritze zudem mit $13 \mu\text{l}$ ($1 -^{14}\text{C}$)-Arachidonsäure aus der verdünnten Stocklösung. Schließlich beträgt nach der 1 : 26 Zumischung die Endkonzentration an markierter Säure $4,5 \times 10^{-8}\text{M}$. Dieser Anteil an der unmarkierten Säure (10^{-5}M) ist demnach kleiner als 0,5 %. Die Zeitpunkte für die Probenentnahmen an der Vena portae-Kanüle folgen mit geringen Abweichungen dem Schema in 2.6.2..

Ferner werden an den Punkten $A_{1/2}$, $B_{1/2}$, $C_{1/2}$, dargestellt in der Abbildung 5, größere Proben (ca. 22 ml) gesammelt, um durch das anschließende Extraktionsverfahren und die Dünnschicht-chromatographie Aufschluß über die chemische Stabilität der Prostaglandinvorstufen und deren tatsächlicher Konzentration vor Ort zu erlangen.

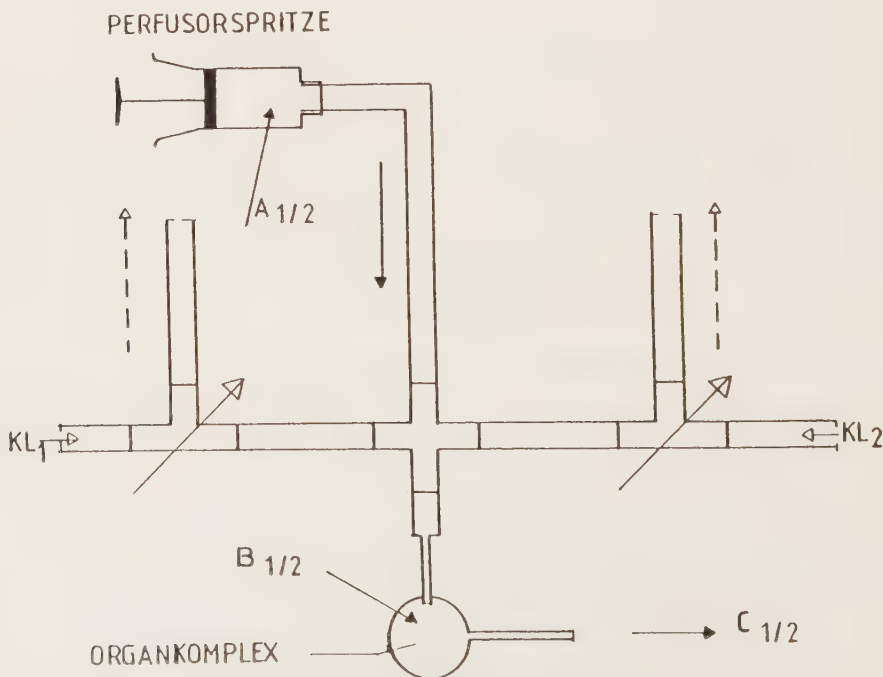


Abb. 5: Schematische Darstellung der Probenentnahmepunkte für die Dünnschichtchromatographie (Vgl. folgender Text und Abb. 4)

- Punkt A₁: Aus der fertig vorbereiteten Perfusorspritze werden unmittelbar vor deren Installation 800 μ l Lösung entnommen und mit 20,8 ml Kontrollösung (=KL) 1:26 verdünnt.
- Punkt B₁: Kurz vor dem Anschluß des Organkomplexes werden bei laufendem Zumischungssystem (KL₂ und Perfusorspritze) an der Spitze der Art. coeliaca-Kanüle ca. 22 ml Lösung aufgefangen.
- Punkt C₁: Nachdem der Organkomplex angeschlossen ist, wird zum Zeitpunkt 0 von der Perfusion mit KL₁ auf KL₂ und die Perfusorspritze umgeschaltet. Das an der Vena portae-Kanüle in den ersten 2-8 Minuten gesammelte Perfusat stellt die Probe C₁ dar.
- Punkt C₂: In den letzten 2-8 Minuten dieses Perfusionsabschnittes gewinnt man die Probe C₂ und schaltet wieder auf die Perfusion mit KL₁ zurück.
- Punkt B₂: Jetzt, am Ende der Perfusion, wird wie in Punkt B₁ verfahren.
- Punkt A₂: Analoges Vorgehen wie in Punkt A₁.

Diese Proben für die Aktivitätsverlaufskurven und die Dünnschichtchromatographie werden sofort weiterverarbeitet.

2.8.3 Messung des Aktivitätsverlaufes

Von den erhaltenen Proben werden je 260 μ l in ein Szintillationsgefäß pipettiert, mit 10 ml Unisolv Szintillationsflüssigkeit vermischt und bei 4°C im β -Zähler (β - Szint BF 5000; Kanal C) über 10 min gemessen. Die Grundaktivität beträgt 27-29 cpm.

2.8.4 Qualitatives Nachweisverfahren mit der Dünnschichtchromatographie

2.8.4.1 Extraktionsverfahren

Die Radioaktivität der ($1\text{-}^{14}\text{C}$)-Arachidonsäure und der $8,11,14\text{-}(1\text{-}^{14}\text{C})$ -Eicosatriensäure ist in den wässrigen Lösungen der Proben $A_{1/2}$, $B_{1/2}$ und $C_{1/2}$ zu gering, um sie nach dem Auftragen auf eine "Thin Layer Chromatography" (=TLC)-Platte im Scanner noch messen zu können.

Deshalb muß ein Extraktionsverfahren dazwischengeschaltet werden. Da es sich um langkettige, hochungesättigte Fettsäuren handelt, verspricht ein hydrophobes Extraktionsmedium eine Anreicherung.

Aus Vorversuchen bietet sich als günstiges Extraktionsmedium ein Chloroform-Methanol-Gemisch (9 : 1 v/v; pro analysii von Merck, Darmstadt) an (analog (34), (202)). Jede der Proben $A_{1/2}$, $B_{1/2}$ und $C_{1/2}$ wird dem folgenden Extraktionsverfahren unterzogen.

Von jeder Probe werden 20 ml in 5 ml H_2O aufgenommen und mit konzentrierter Ameisensäure auf das pH von 3 gebracht (55), (152), da die Fettsäuren in undissoziiertem Zustand hydrophober sind. Nun wird 3 min mit 10 ml Chloroform-Methanol-Gemisch geschüttelt und die anschließende Entmischung durch das Zentrifugieren bei 2500 Upm beschleunigt. Mit Hilfe von Pasteurpipetten trennt man die überstehende wässrige Phase ab, die noch zweimal mit je 5 ml extrahiert wird.

Der Extrakt (ca. 20 ml) wird in einem Birnenkolben bei 35°C und Unterdruck eingedampft, wobei gegen Ende zugegebener absoluter Äthanol (1,5 ml) die Ameisensäure austreibt. Der Rückstand wird in 500 μl Essigsäureäthylester und 100 μl absolutem Äthanol aufgenommen und in ein Eppendorf-Gefäß überführt, wo ein feiner Stickstoffstrahl die Lösungsmittel erneut verdampft. Diese Prozedur wiederholt man noch einmal. Die im Eppendorf-Gefäß angereicherten Prostaglandinvorstufen werden zweimal nacheinander in 20 μl absolutem Äthanol gelöst und auf eine TLC-Platte (s.u.) aufgebracht.

Die dazu durchgeführte Bestimmung der Extraktionsausbeute ergab für die (1-¹⁴C)-Arachidonsäure z.B. in der Probe A₁ 73 % und in C₂ 48 %. Demgegenüber sind die Quoten für die 8,11,14-(1-¹⁴C)-Eicosatriensäure niedriger (A₁ : 54 % ; C₂ : 38 %). Die größte Anreicherung wird im ersten Extraktionsschritt erzielt, wogegen sich die Verluste gleichmäßig über die Restlösungen und Rückstände verteilen.

2.8.4.2 Auftragung und Trennung auf "Thin Layer Chromatography"-Platte

Die TLC-Platten (20 x 20 cm), mit 0,25 mm Kieselgel 60 beschichtet, liefert die Firma Merck, Darmstadt. Vor der Verwendung trocknen die Platten eine Stunde bei 120°C (48). Die Auftragspunkte müssen einen genügend großen Abstand vom Plattenrand haben, da seitlich Unregelmäßigkeiten in der Laufmittelfront vorkommen. Ein kleiner Startpunkt mit hoher Stoffkonzentration wird durch die fraktionierte Auftragung der angereicherten Prostaglandinvorstufen (vgl. 2.8.4.1) und der zwischenzeitlichen Trocknung im Stickstoffstrom erzielt. Je 5 µl einer 1 : 10 Äthanolverdünnung der Stocklösungen von (1-¹⁴C)-Arachidonsäure und 8,11,14-(1-¹⁴C)-Eicosatriensäure dienen als Referenzen R_A bzw. R_E. In der Stickstoff-gefüllten Trennkammer tauchen die TLC-Platten bis zu einem Zentimeter unter den Auftragspunkten in das Laufmittel ein. Dieses besteht aus der organischen Phase einer Essigsäureäthylester-Isooctan-Eisessig-Wasser-Mischung (11:3:2:10 v/v/v/v; pro analysii von Merck, Darmstadt) (30), (34), (84). Wenn die Laufmittelfront kurz vor dem oberen Rand steht, zeichnet man diese an und trocknet anschließend die Platte.

2.8.4.3 Messung im "Thin Layer Chromatography" - Scanner

Das Abtasten der Bahnen auf der TLC-Platte mit dem Scanner vom Startpunkt bis zur Laufmittelfront geschieht mit einer Bleifolien-bespannten Blende (2 x 36 mm). Dem maximalen Schreiberanschlag von 10 cm entspricht eine Impulsrate von 100 cps (counts

per second). Zum Vorschub von 300 mm/h wird eine Trägheit von 10 sRC gewählt, die verzerrungsfreie Peaks gewährleistet.

2.9 Auswertung der Ergebnisse und Statistik

Die Berechnung der Insulinsekretionsraten in $\mu\text{U}/\text{min}$ aus den Einzelproben wird in 2.7.6 erläutert.

Die Experimente mit gleichartigen Bedingungen werden zu Mittelwertskurven ($\pm$ Standard Error of Mean) zusammengefaßt.

Die Flächen unter den Kurven sind mit den Absolutmengen sezernierten Insulins pro Zeitraum identisch. Das Prinzip der Flächenberechnung besteht in der Mittelwertbildung zweier benachbarter Meßpunkte, multipliziert mit dem Zeitabstand in Minuten. Per Computer werden diese Flächenintegrale in den Einzelexperimenten für bestimmte Zeiträume, ersichtlich aus den Tabellen 1 - 5, berechnet, addiert und gemittelt. Die Grenzen der Flächenintegrale werden in Anlehnung an ZAWALICH et al. (198) und TIENGO et al. (180) gewählt.

Der unpaarige Flächenvergleich fordert den Student-T-Test für unverbundene Stichproben, in den Flächenmittelwerte mit der Standardabweichung und der Experimentanzahl direkt eingesetzt werden können.

Dagegen ist für Vergleiche von Integralen in einem Experiment, wenn auch an mehreren Experimenten mit denselben Versuchsbedingungen durchgeführt, der Student-T-Test für verbundene Stichproben heranzuziehen.

Für paarige Punktvergleiche, wie z.B. vor und nach Umschaltvorgängen, wird ebenfalls der zuletztgenannte Test benützt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Aktivitätsverlaufskurven von (1-¹⁴C)-Arachidonsäure und 8,11,14-(1-¹⁴C)-Eicosatriensäure

Da der direkte chemische Nachweis der Testsubstanzen mit größtem Aufwand verbunden wäre, bedient man sich der radioaktiv markierten Vertreter, um den Konzentrationsverlauf beurteilen zu können.

Mit einer Latenz von 30 bis 60 Sekunden nach dem Umschaltvorgang erscheinen die radioaktiven Testsubstanzen an der Venaportae-Kanüle, was sich in einem steilen Aktivitätsanstieg ausdrückt (Abb. 6 und 7).

Der Aktivitätsverlauf erreicht nach dem initialen Anstieg ungefähr ab der 10. Minute ein leicht abfallendes Niveau (Abb. 6 und 7).

Diese Tatsache ist durch eine zunehmende Retention der ungesättigten Fettsäuren im Organkomplex erklärbar.

Nach dem Zurückschalten auf die Ausgangsbedingungen fällt die Aktivität binnen 3 - 5 Minuten fast auf die Vorwerte (Abb. 6 und 7) ab.

Zusammenfassend läßt sich hierzu konstatieren, daß diese Versuchsanordnung mit dem System der Zumischung der hochungesättigten Fettsäuren in die Perfusionslösung unmittelbar vor der Organpassage geeignet ist, keine diskrepanten zeitlichen Verzögerungen beim Umschaltvorgang und keine exzessiv großen Schwankungen im Testsubstanzzufluß auftreten zu lassen.

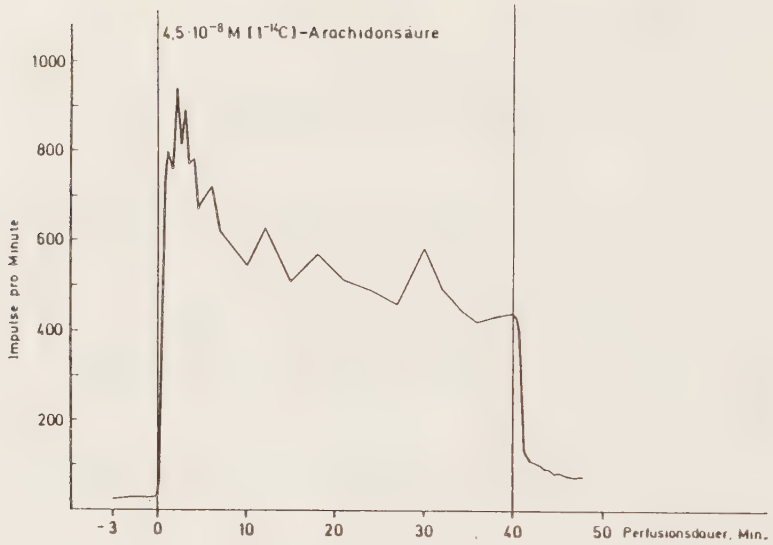


Abb. 6: Aktivitätsverlaufskurve von $(1-^{14}\text{C})\text{-Arachidonsäure}$.

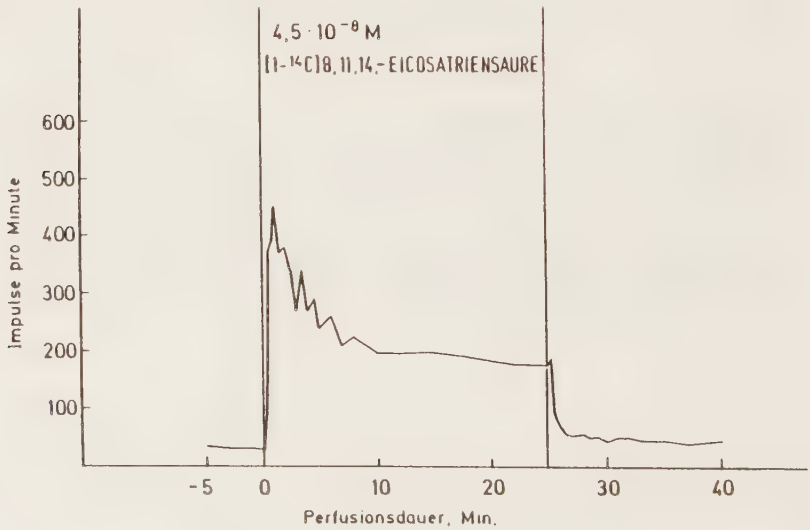


Abb. 7: Aktivitätsverlaufskurve von $8,11,14\text{-(}1-^{14}\text{C)}\text{-Eicosatrien-säure}$

3.2 Chemische Stabilität der Prostaglandinvorstufen während der Experimente

3.2.1 Qualitativ

Die aus den Proben $A_{1/2}$ und $B_{1/2}$ extrahierte (vgl. 2.8.2 und 2.8.4) und mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie analysierte ($1-^{14}\text{C}$)-Arachidonsäure und 8,11,14-($1-^{14}\text{C}$)-Eicosatriensäure zeigen, daß die Form und Lokalisation der Aktivitätsgipfel mit den Referenzsubstanzen R_A bzw. R_E identisch sind (Abb. 9 - 12). Demnach kommt es bei der Perfusion der beiden Säuren nicht zu einem Abbau.

In den Proben nach der Organpassage ($C_{1/2}$) imponiert bei der ($1-^{14}\text{C}$)-Arachidonsäure eine zusätzliche chromatographisch langsam laufendere Substanz (Abb. 8 - 10), wogegen die 8,11,14- ($1-^{14}\text{C}$)Eicosatriensäure-Peaks keine chemische Veränderungen erfahren. (Abb. 11 und 12).

Die Arachidonsäure wird also offensichtlich z.T. in einen weniger stark lipophilen Metaboliten umgewandelt und zwar im Zeitraum C_1 möglicherweise mehr als in C_2 .

3.2.2 Semiquantitativ

Die Fläche unter den Impulsausschlägen ist der Radioaktivität direkt proportional. In den Abbildungen 9 - 12 repräsentiert der $R_{A/E}$ -Peak die theoretisch in den Proben $A_{1/2}$, $B_{1/2}$ sowie $C_{1/2}$ eingesetzte Aktivität, wogegen R_A in der Abb. 8 nur ein Fünftel davon darstellt.

Im Vergleich zur theoretisch eingesetzten Aktivität $R_{A/E}$ erscheinen davon noch 40 - 50 % nach dem Extraktionsverfahren in den Proben ohne die Organpassage ($A_{1/2}$, $B_{1/2}$) auf den TLC-Platten (Abb. 9 - 12).

Die Organpassage mindert diese Quoten bei der ($1-^{14}\text{C}$)-Arachidonsäure auf die Hälfte und bei der ($1-^{14}\text{C}$)-Eicosatriensäure auf ein Viertel.

Unter Berücksichtigung der verschiedenen Extraktionsausbeuten von $A_{1/2}$ gegenüber $C_{1/2}$ (vgl. 2.8.4) lassen sich die Retentionswerte im Organkomplex abschätzen.

Von der Arachidonsäure werden ca. 50 % und von der Eicosatriensäure ca. 65 % zurückgehalten. Ein Grund für die hohe Retention der Prostaglandinpräkursoren dürfte in der ausgeprägten Lipophilie als langkettige, hochungesättigte Fettsäuren liegen, wobei eine geringere Anzahl von Doppelbindungen die Fettlöslichkeit steigert (48).

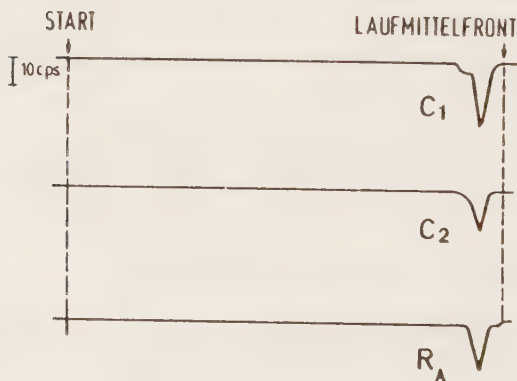


Abb. 8: TLC-Scann von $(1-^{14}\text{C})$ -Arachidonsäure nach der Organpassage im Zeitraum C_1 und C_2 (vgl. Punkt 2.8.2). Die Referenzsubstanz R_A stellt ein Fünftel der in $C_{1/2}$ eingesetzten Gesamtaktivität dar.

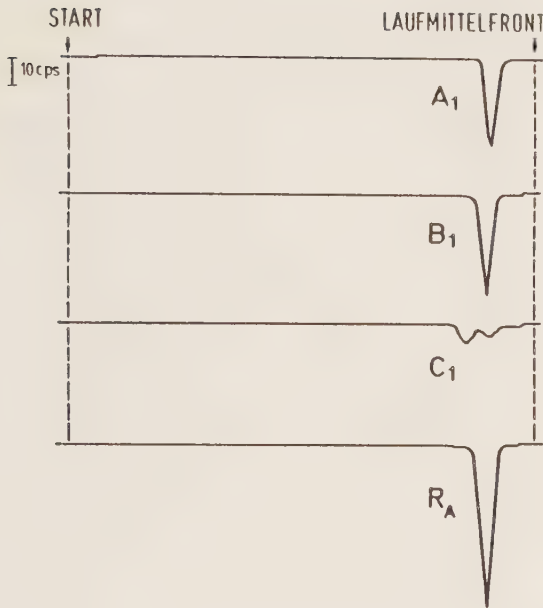


Abb. 9: TLC-Scann von (1-¹⁴C)-Arachidonsäure in der ersten Hälfte des Experiments an den Punkten A (= Perfusor) B (= Art. coeliaca-Kanüle) und C (= nach dem Organ-komplex an der Vena portae-Kanüle). Referenzsubstanz R_A (= theoretisch, d.h. ohne Extraktionsverfahren eingesetzte Aktivität), (vgl. 2.8.2.)

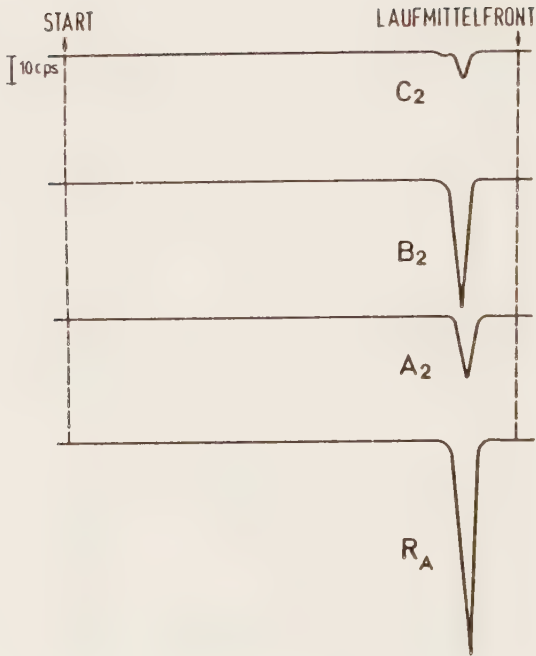


Abb. 10: TLC-Scann von $(1-^{14}\text{C})$ -Arachidonsäure in der zweiten Hälfte des Experiments an den in Abb. 9 genannten Punkten.
(R_A wie in Abb. 9)

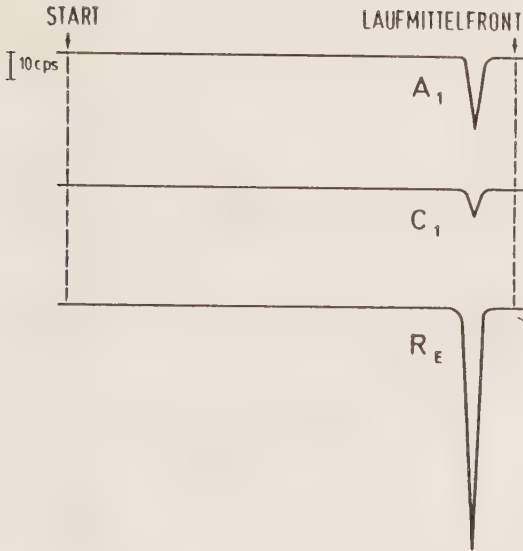


Abb. 11: TLC-Scann von 8,11,14-(1- 14 C)-Eicosatriensäure in der ersten Hälfte des Experiments an den in Abb. 9 genannten Punkten.

Referenzsubstanz R_E (=theoretisch, d.h. ohne Extraktionsverfahren eingesetzte Aktivität)

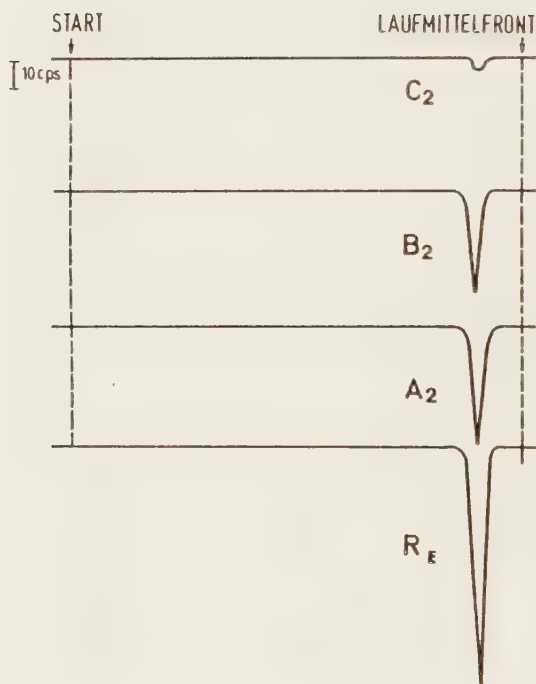


Abb. 12: TLC-Scann von 8,11,14-(1- ^{14}C)-Eicosatriensäure in der zweiten Hälfte des Experiments an den in Abb. 9 genannten Punkten.

(R_E wie in Abb. 11)

3.3 Perfusion mit Prostaglandinvorstufen

3.3.1 8,11,14 Eicosatriensäure, 11,14,17 Eicosatriensäure, Arachidonsäure und 5,8,11,14,17 Eicosapentaensäure in Kontrolllösung

Nach dem Zumischen der o.g. Substanzen in einer Konzentration von 10^{-5} M in die Kontrolllösung ändern sich weder die Kinetik noch die Menge des sezernierten Insulins eindeutig (Abb. 13-16).

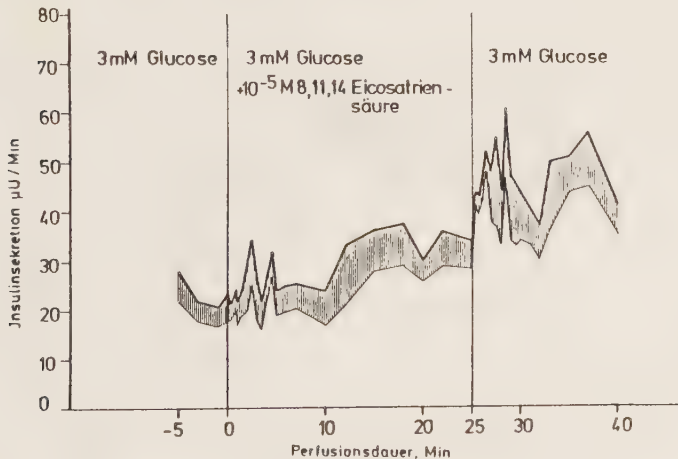


Abb. 13: Der Einfluß von 10^{-5} M 8,11,14 Eicosatriensäure auf die basale Insulinsekretion (n = 5, Mittelwertskurve $\pm$ SEM)

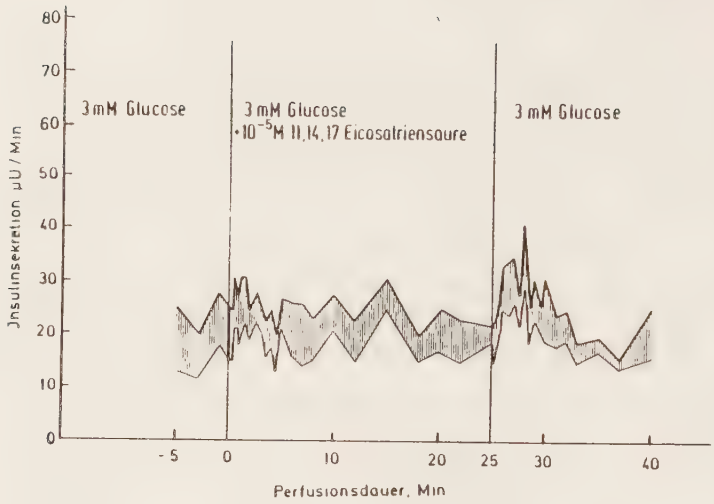


Abb. 14: Der Einfluß von 10^{-5}M 11,14,17 Eicosatriensäure auf die basale Insulinsekretion ($n = 5$, Mittelwertskurve $\pm$ SEM)

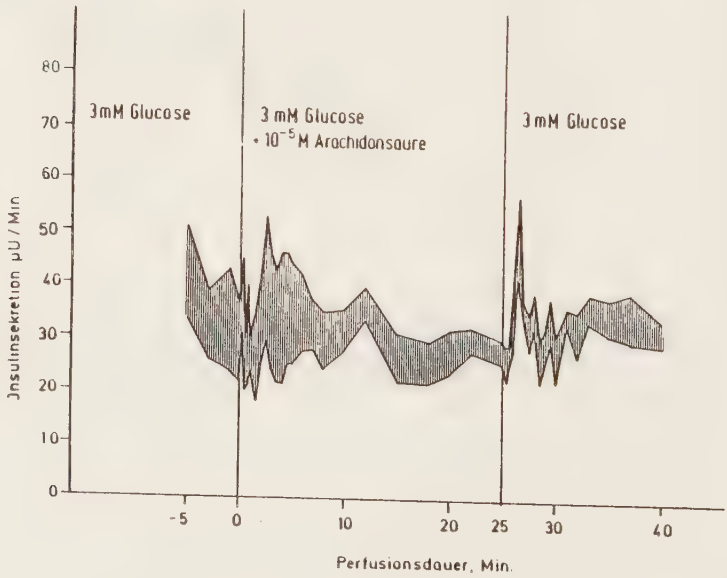


Abb. 15: Der Einfluß von 10^{-5}M Arachidonsäure auf die basale Insulinsekretion ($n = 4$, Mittelwertskurve $\pm$ SEM)

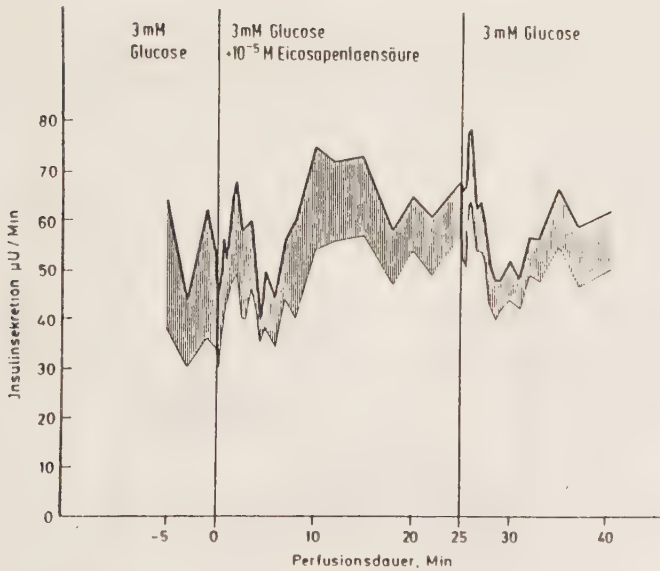


Abb. 16: Der Einfluß von 10^{-5} M 5,8,11,14,17 Eicosapentaensäure auf die basale Insulinsekretion (n = 6, Mittelwertskurve $\pm$ SEM)

3.3.2 8,11,14 Eicosatrien-, 11,14,17 Eicosatrien-, Arachidon- und 5,8,11,14,17 Eicosapentaensäure in Stimulationslösung

Die Stimulation mit 20 mM Glucose über 40 Minuten zeigt das bekannte biphasische Sekretionsmuster der Insulinausschüttung. Ab der 10. Minute tritt keine signifikante Steigerung der Sekretionsraten mehr ein (vgl. Tab. 1), d.h. das Plateau ist erreicht.

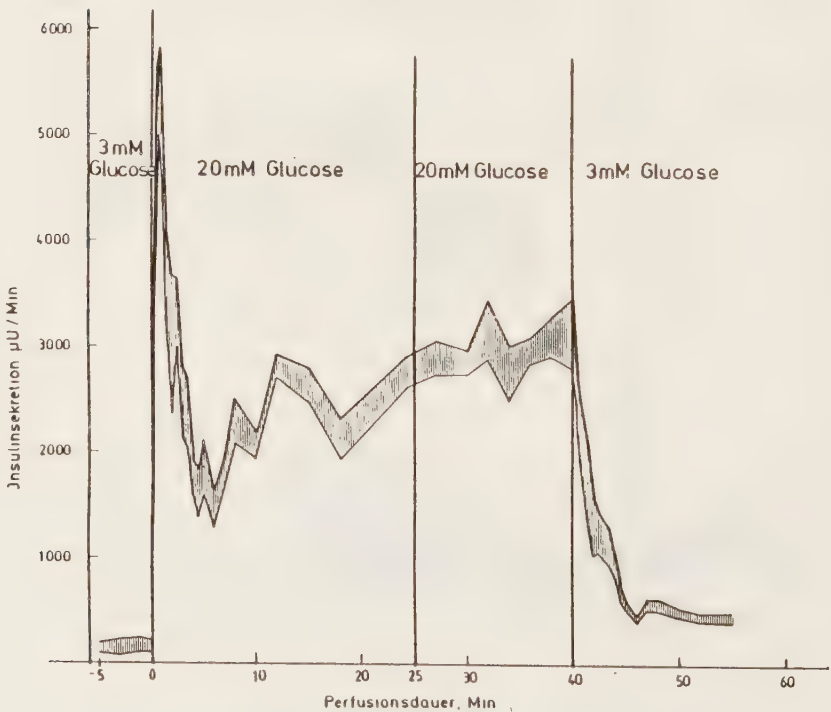


Abb. 17: Perfusion mit 20 mM Glucose über 40 Minuten
(n = 6, Mittelwertskurve $\pm$ SEM)

Die in den Versuchen der Abbildungen 18 bis 21 durchgeführte Prästimulation mit 20 mM Glucose zeigt das bekannte biphasische Sekretionsmuster mit dem initialen Peak (= erste Phase: 0 - 5.Min.) und die nach einem Tiefpunkt auf ein Plateau ansteigende zweite Phase (5.- 25.Min.).

Die Addition der o.g. Prostaglandinpräkursoren (10^{-5} M) in diese Sekretionsphase (25.- 50.Min.) läßt keine signifikanten Abweichungen der Insulinausschüttung sowohl im Hinblick auf die Quantität (vgl. Tab. 1) als auch auf den Kurvenverlauf (Abb. 18 - 21) erkennen.

Nach dem Entzug des Stimulans fällt die Sekretionsrate in den ersten fünf Minuten steil ab, bleibt dann aber weiterhin deutlich über den Prästimulationswerten bestehen.

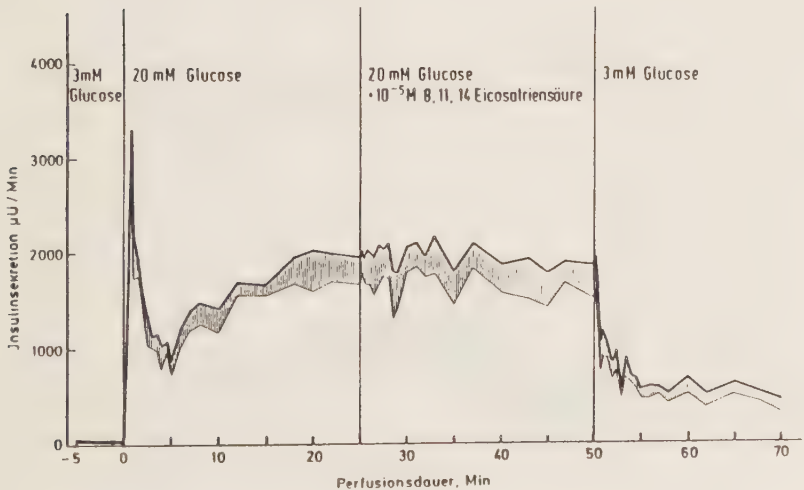


Abb. 18: Vorperfusion mit 20 mM Glucose und der Einfluß von 10^{-5} M 8,11,14 Eicosatriensäure auf die zweite Phase der Glucose-induzierten Insulinsekretion (n = 6, Mittelwertskurve $\pm$ SEM)

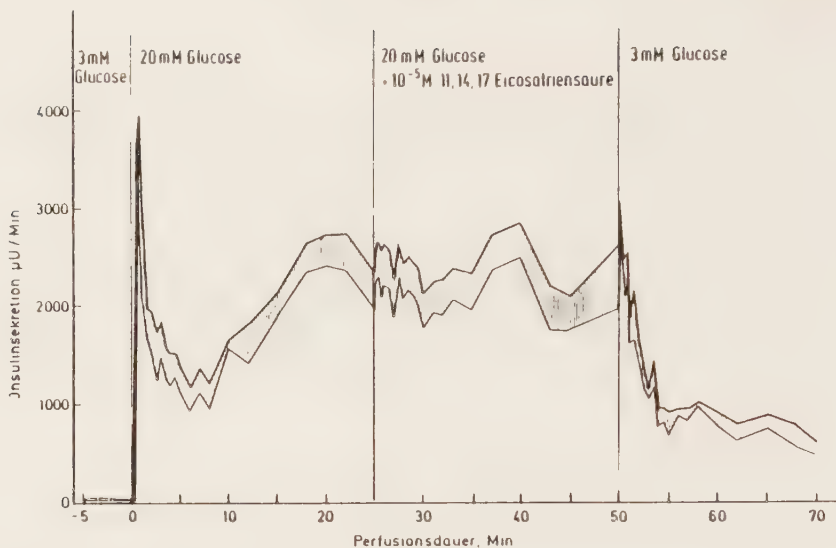


Abb. 19: Vorperfusion mit 20 mM Glucose und der Einfluß von $10^{-5}M$ 11,14,17 Eicosatriensäure auf die zweite Phase der Glucose-induzierten Insulinsekretion ($n = 6$, Mittelwertskurve $\pm$ SEM)

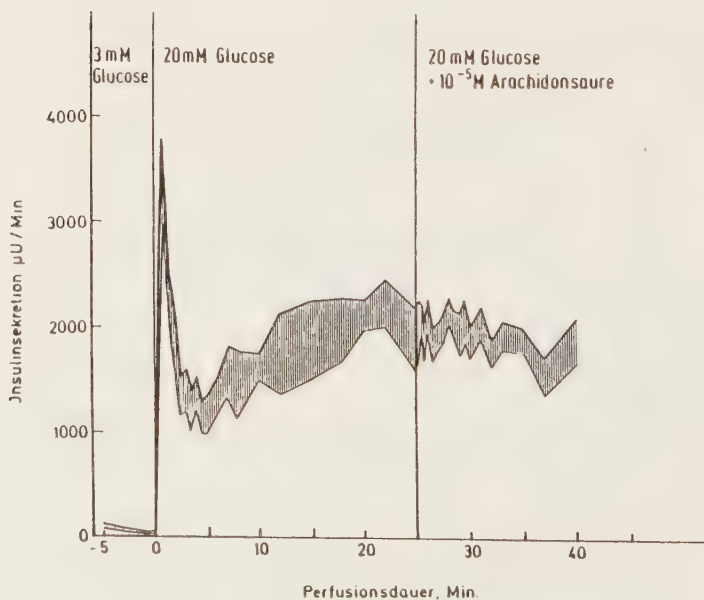


Abb. 20: Vorperfusion mit 20 mM Glucose und der Einfluß von $10^{-5}M$ Arachidonsäure auf die zweite Phase der Glucose-induzierten Insulinsekretion ($n = 6$, Mittelwertskurve $\pm$ SEM)

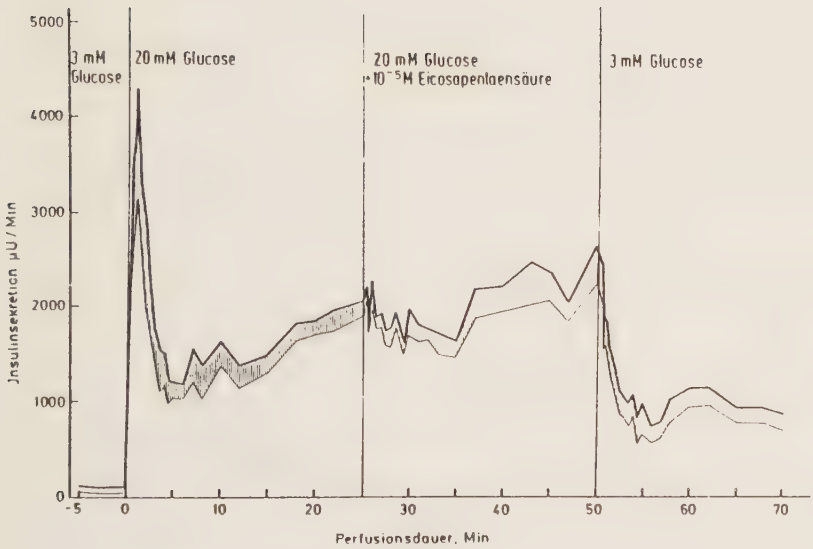


Abb. 21: Vorperfusion mit 20 mM Glucose und der Einfluß von 10^{-5} M 5,8,11,14,17 Eicosapentaensäure auf die zweite Phase der Glucose-induzierten Insulinsekretion ($n = 7$, Mittelwertskurve $\pm$ SEM)

Tabelle 1: Vergleiche von Flächenintegralen aus den Experimenten mit Prostaglandinpräkursoren (Mittelwerte $\pm$ SEM)

Durchschnittliche Insulinsekretion (μ U/min)		Steigerung (%)	Signifi- kanz Niveau
20 mM Glucose (10.-25. Min.)	←→ 20 mM Glucose plus...		
	(25.-40. Min.)		
2651 $\pm$ 223	3140 $\pm$ 326	21 $\pm$ 12,5	N.S.
	... 10 ⁻⁵ M 8,11,14 Eicosatriensäure		
1840 $\pm$ 197	1982 $\pm$ 264	10 $\pm$ 13,5	N.S.
	... 10 ⁻⁵ M 11,14,17 Eicosatriensäure		
2373 $\pm$ 620	2391 $\pm$ 315	1,3 $\pm$ 8,8	N.S.
	... 10 ⁻⁵ M Arachidonsäure		
2225 $\pm$ 1368	2634 $\pm$ 252	7,1 $\pm$ 13,7	N.S.
	... 10 ⁻⁵ M 5,8,11,14,17 Eicosapentaensäure		
1705 $\pm$ 403	1870 $\pm$ 168	11,8 $\pm$ 7,7	N.S.
Vergleich der prozentualen Steigerung der Sekretionsraten;			
20 mM Glucose	←→ 20 mM Glucose plus...		Signifi- kanz Niveau
	... 10 ⁻⁵ M 8,11,14 Eicosatriensäure		
21 $\pm$ 12,5	10 $\pm$ 13,5		N.S.
	... 10 ⁻⁵ M 11,14,17 Eicosatriensäure		
21 $\pm$ 12,5	1,8 $\pm$ 8,8		N.S.
	... 10 ⁻⁵ M Arachidonsäure		
21 $\pm$ 12,5	7,1 $\pm$ 13,7		N.S.
	... 10 ⁻⁵ M Eicosapentaensäure		
21 $\pm$ 12,5	11,8 $\pm$ 7,7		N.S.

3.4 Perfusionen mit Äthanol

3.4.1 Einfluß von Äthanol auf die basale Insulinsekretion

0,1 Vol% Äthanol führt bei substimulatorischer Glucosekonzentration zu keiner signifikanten Änderung der Insulinsekretion (Abb. 22).

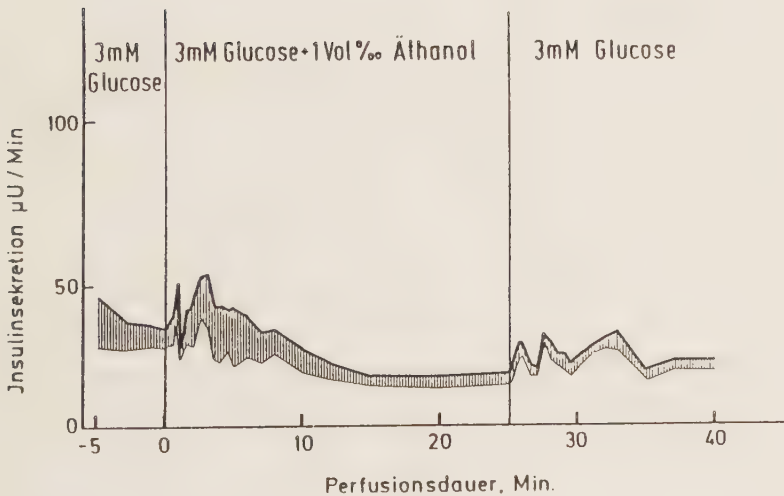


Abb. 22: Der Einfluß von 0,1 Vol% Äthanol auf die basale Insulinsekretion ($n = 4$, Mittelwertskurve $\pm$ SEM)

3.4.2 Einfluß von Äthanol auf die Glucose-induzierte Insulinsekretion

Im Vergleich zur Glucose-induzierten Insulinsekretion (Abb. 17) führt die gleichzeitige Perfusion von Glucose (20 mM) plus 0,05 Vol% Äthanol zu keiner Änderung der Insulinsekretion.

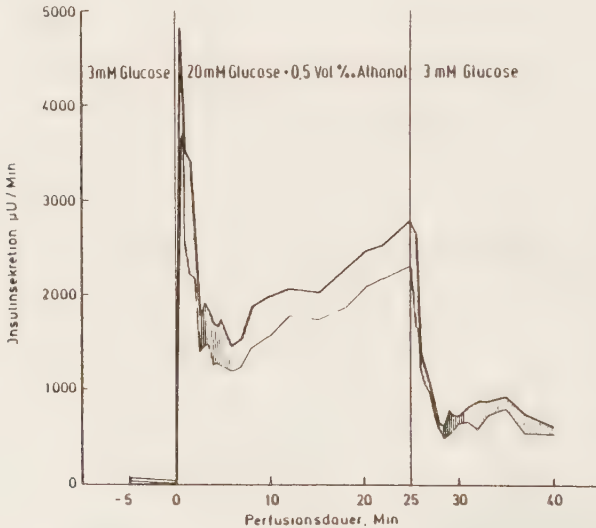


Abb. 23: Der Einfluß von 0,05 Vol% Äthanol auf die mit 20 mM Glucose induzierte Insulinsekretion ($n = 5$, Mittelwertskurve $\pm$ SEM)

Ebenso besteht kein signifikanter Unterschied zu den beiden Phasen der Glucose-induzierten Insulinsekretion in den Präperfusionsabschnitten bei den Experimenten mit den Prostaglandinpräkursoren (Abb. 18-21).

3.5 Perfusionen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Kalzium, Theophyllin und D 600 in verschiedenen Kombinationen miteinander

3.5.1 Der Einfluß von Theophyllin auf die Glucose-stimulierte Insulinsekretion

Die Abb. 24 b zeigt in der unteren Kurve die mit 20 mM Glucose allein induzierte Insulinausschüttung bei physiologischer Ca^{++} -Konzentration von 2,5 mM.

In der ersten Versuchsreihe (Abb. 24 a-c) wird zunächst in der Kontrollphase (-5' - 0') ohne Glucose, wie auch in den

sich anschließenden 25 Min., in denen jedoch 5 mM Theophyllin vorhanden sind, vorperfundiert. Diese Perfusionsbedingungen führen zu keiner nennenswerten Steigerung der basalen Insulinausschüttung.

Wird zum Zeitpunkt 25. Min. zusätzlich mit 20 mM Glucose stimuliert, so kommt es zu einer Potenzierung der biphasischen Insulinsekretion (vgl. Abb. 24 b; Tabelle 2, A gegen C). Unter denselben Bedingungen, aber einmal mit auf 0,5 mM erniedrigtem Kalzium (Abb. 24 a), und zum anderen mit auf 5 mM erhöhtem Kalzium (Abb. 24 c) in der Theophyllin-Glucose-Stimulationsphase, ergibt sich ein ähnlich deutlicher Anstieg der Insulinausschüttung gegenüber den Kontrollexperimenten (Tab. 2, A--B, A--D). Ein Vergleich beider Phasen zwischen den Bedingungen 0,5 mM Ca^{++} und 2,5 mM Ca^{++} läßt keinen (Tab. 2, B--C) Unterschied erkennen. Signifikant geringer ist die Insulinsekretion jedoch bei 5 mM Ca^{++} gegenüber 2,5 mM Ca^{++} (Tab. 2, D--C).

Der Wechsel von ausschließlich 5 mM Theophyllin enthaltendem (50'-75') zu von Theophyllin freiem Perfusionsmedium bewirkt eine schnelle, vorübergehend erhöhte Insulinsekretion bei Vorbehandlung mit 0,5 mM Ca^{++} und 2,5 mM Ca^{++} , jedoch nicht bei 5 mM Ca^{++} . Der höchste Punkt, bezogen auf den Wert zum Zeitpunkt 75', ergab eine Steigerung um $52 \pm 10 \%$ ($p = 0,05$) bzw. $123 \pm 55 \%$ ($p = 0,025$), (vgl. Abb. 24 a,b).

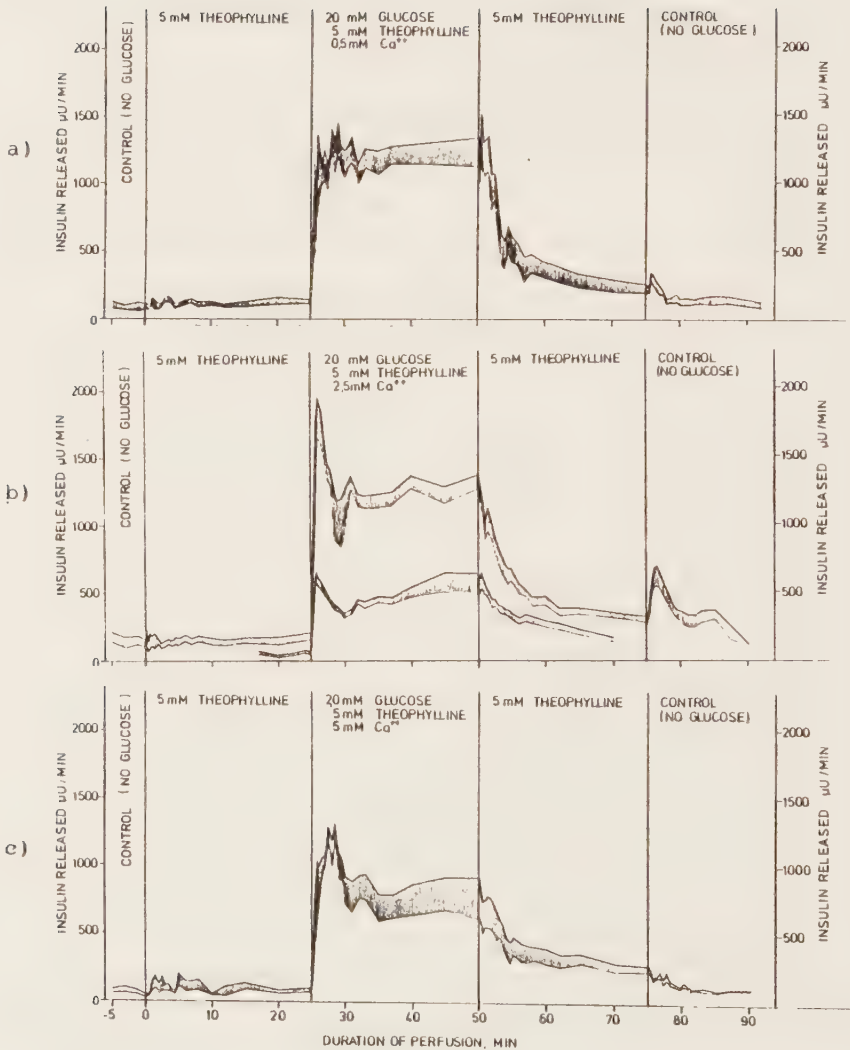


Abb. 24 a -c: Der Einfluß der Vorperfusion mit 5 mM Theophyllin auf die Glucose-induzierte Insulinfreisetzung bei niedrigem (0,5 mM, n = 5), normalem (2,5 mM, n = 7) und hohem (5 mM, n = 4) Kalzium. Die untere Kurve in der Abb. 24 b zeigt das bei 2,5 mM Ca^{++} durch Glucose allein hervorgerufene Sekretionsprofil. (n = 10, Mittelwertskurven $\pm$ SEM)

Tabelle 2: Vergleiche von Flächenintegralen (=Insulinmengen in μU) der Experimente in der Abbildung 24 a -c.

Experimentelle Bedingungen			Sezerniertes Insulin in μU ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	
Anzahl der Experimente		mmol/l	Erste Phase 25.-30. Min.	Zweite Phase 30.-50. Min.
A (10)	Glucose	20	$2\,310 \pm 201$	$10\,907 \pm 1\,785$
	Ca^{2+}	2,5		
B (5)	Glucose	20	$6\,051 \pm 935$	$25\,919 \pm 3\,205$
	Theophyllin Ca^{++}	5 0,5		
C (7)	Glucose	20	$7\,000 \pm 536$	$25\,921 \pm 2\,105$
	Theophyllin Ca^{++}	5 2,5		
D (4)	Glucose	20	$5\,250 \pm 207$	$17\,835 \pm 4\,663$
	Theophyllin Ca^{++}	5 5		

Vergleiche:

A -- B	$p \leq 0,0005$	$p \leq 0,0005$
A -- C	$p \leq 0,00005$	$p \leq 0,0005$
A -- D	$p \leq 0,00005$	$p \leq 0,05$
B -- C	N.S.	N.S.
B -- D	N.S.	N.S.
D -- C	$p \leq 0,025$	$p \leq 0,005$

In einer zweiten Experimentreihe wird zunächst 25 Minuten lang mit 20 mM Glucose vorperfundiert (Abb. 25 a-c), woraus sich das bekannte biphasische Sekretionsmuster ergibt. In die zweite Phase werden ab der 25. Minute 2, 5 oder 10 mM Theophyllin dazugegeben.

Mit allen drei geprüften Theophyllinkonzentrationen kommt es zu einer vorübergehenden Hemmung der Insulinsekretion, die bezogen auf die vorherige Sekretionsrate in der 25. Min. eine Erniedrigung derselben um $32 \pm 9 \%$ ($p \leq 0,01$) bei 2 mM, um $22 \pm 6 \%$ ($p \leq 0,025$) bei 5 mM und um $32 \pm 4 \%$ ($p \leq 0,001$) bei 10 mM Theophyllin erreicht.

Ein Vergleich der sezernierten Insulinmengen von sich entsprechenden Zeiträumen (5.-25. Min. und 30.-50. Min.) führt beim Zusatz der drei genannten Theophyllinkonzentrationen zu einer Steigerung der Ausschüttung um $84 \pm 26\%$ ($p \leq 0,01$), um $140 \pm 48 \%$ ($p \leq 0,005$) und um $52 \pm 23 \%$ ($p \leq 0,05$) (Tab. 3). Es findet sich kein signifikanter Unterschied in der Höhe der Ausschüttungsmengen bei den verschiedenen Theophyllinkonzentrationen (Tab. 3: A--B, A--C, B--C).

Ebenso besteht keine Auswirkung auf die zweite Phase der Insulinsekretion, induziert durch 20 mM Glucose mit 5 mM Theophyllin bei 2,5 mM Ca^{++} , ob mit 5 mM Theophyllin allein oder ausschließlich mit 20 mM Glucose vorperfundiert wird (Tab. 2,C, rechte Spalte mit Tab. 3, B, rechte Spalte: $25921 \pm 2105 \mu\text{U}/20 \text{ min}$ mit $26309 \pm 2906 \mu\text{U}/20 \text{ min}$).

Der Entzug von Theophyllin aus dem Medium bei fortdauernder Perfusion mit 20 mM Glucose verursacht einen kurzfristigen Anstieg der Insulinausschüttung, bezogen auf die Sekretionsrate in der 50. Minute und zwar um $18 \pm 5 \%$ ($p \leq 0,01$) bei 2mM, um $38 \pm 20 \%$ ($p \leq 0,05$) bei 5 mM und um $34 \pm 22 \%$ (N.S.) bei 10 mM Theophyllin (Abb. 25 a-c). Diese drei prozentualen Steigerungen sind voneinander nicht signifikant verschieden.

Der maximal steigernde oder hemmende Effekt einer neu hinzugefügten Substanz, bezogen auf die unmittelbar vorausgehende Sekretionsrate, tritt innerhalb der ersten Minute wegen der diskontinuierlichen Probenahme in unterschiedlichen Zeitpunkten auf.

Die Mittelwertskurven in den Abbildungen verschleiern deshalb diese Effekte, wie z.B. in der Abbildung 25 a, wo nach der 50. Minute kein Insulinausschüttungsgipfel zu erkennen ist, obwohl eine Signifikanz aus dem Student-t-Test für verbundene Stichproben resultiert.

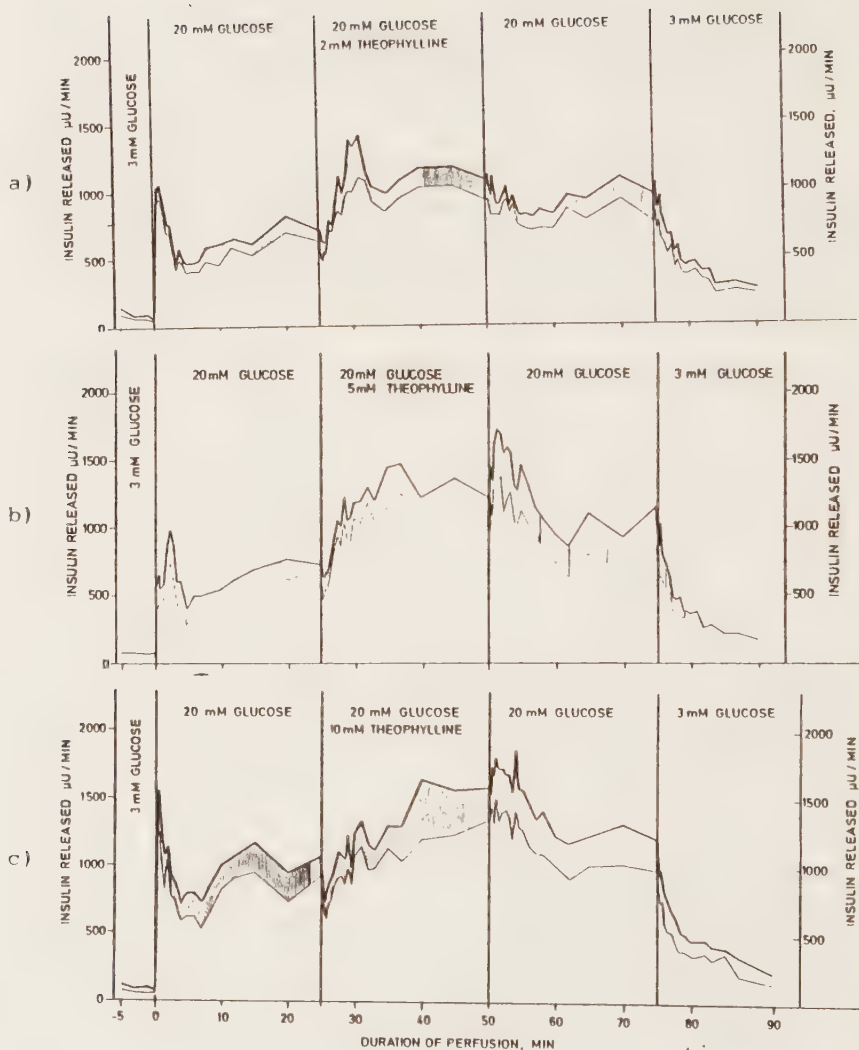


Abb. 25 a-c: Vorperfusion mit 20 mM Glucose und der Einfluß von 2 mM ($n = 6$), 5 mM ($n = 6$) und 10 mM ($n = 5$) Theophyllin auf die zweite Phase der Glucose-induzierten Insulinsekretion (Mittelwertskurven $\pm$ SEM)

Tabelle 3: Vergleiche von Flächenintegralen (Insulinmengen in μU) der Experimente in der Abbildung 25 a-c.

Experimentelle Bedingungen		Sezerniertes Insulin in μU ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)		Signifikanz-niveau Steigerung der Sekretions- rate $\pm \text{SEM}$	
		zweite Phase 5.-25.Min.		zweite Phase 30.-50.Min.	
(Anzahl)		mM		mM	
A	Glucose	20		20	
	Theophyllin	-	13284	2	22676
	Ca^{++}	2,5	± 1722	2,5	± 2410
(6)					$p \leq 0,01$ $84 \pm 26 \%$
B	Glucose	20		20	
	Theophyllin	-	13072	5	26309
	Ca^{++}	2,5	± 3157	2,5	± 2926
(6)					$p \leq 0,005$ $140 \pm 48\%$
C	Glucose	20		20	
	Theophyllin	-	19972	10	29108
	Ca^{++}	2,5	± 3750	2,5	± 5501
(5)					$p \leq 0,005$ $52 \pm 23\%$

Vergleiche:

A--B	N.S.	N.S.
A--C	N.S.	N.S.
B--C	N.S.	N.S.

3.5.2 Der Einfluß der Änderung der extrazellulären Kalziumkonzentration auf die Sekretionswirkung von 20 mM Glucose und 5 mM Theophyllin

Einem bei physiologischer, extrazellulärer Kalziumkonzentration mit 20 mM Glucose vorstimulierten Pankreas werden gleichzeitig im Perfusionsmedium die Ca^{++} -Konzentration auf 0,5 mM gesenkt und 5 mM Theophyllin hinzugefügt. Dies hemmt die Insulinsekretion initial für 2-4 Minuten (tiefster Punkt), bezogen auf die vorausgehende in der 25. Minute gemessene Insulinsekretion um $40 \pm 11 \%$ ($p \leq 0,025$), (Abb. 26'a).

Die analoge Situation bei 2,5 mM Ca^{++} läßt eine maximale Erniedrigung der Insulinsekretion um $22 \pm 6 \%$ ($p \leq 0,025$) und bei 5 mM Ca^{++} um $28 \pm 3 \%$ ($p \leq 0,005$) erkennen (Abb. 25 b und Abb. 26 b). Das Ausmaß der Hemmung unterscheidet sich bei den verschiedenen Ca^{++} -Konzentrationen nicht signifikant voneinander.

Der bei 2,5 mM Ca^{++} (Abb. 25 b) und 5 mM Ca^{++} (Abb. 26 b) zwischen der 30. und 50. Minute beobachtete, postinhibitorische Anstieg der Sekretionsraten ($140 \pm 48 \%$, $p \leq 0,005$ bzw. $51 \pm 28 \%$, N.S., vgl. Tab. 4) gegenüber dem Zeitraum von der 5. - 25. Minute tritt bei 0,5 mM Ca^{++} (Abb. 26a) nicht in Erscheinung.

Die Insulinmengen der Vorstimulationsphasen mit 20 mM Glucose (5.-25. Minute) unterscheiden sich nicht signifikant (Tab. 4, erste Spalte : A--B, A--C, B--C).

Jedoch differiert die Insulinmenge im Vergleich der jeweiligen Zeiträume von der 30. - 50. Minute zwischen 0,5 mM Ca^{++} und 2,5 mM Ca^{++} (Tab. 4, rechte Spalte : A--B, $p \leq 0,005$) und entsprechend 0,5 mM Ca^{++} und 5 mM Ca^{++} (Tab. 4, rechte Spalte: A--C, $p \leq 0,005$) erheblich.

Wiedereinführung der physiologischen Kalziumkonzentration und gleichzeitige Wegnahme des Theophyllins führt zu einem vorübergehenden Sekretionsanstieg gegenüber der Sekretionsrate in der 50. Minute. Dieser Anstieg beträgt in der Abb. 26 a $96 \pm 22 \%$ ($p \leq 0,01$), in der Abb. 25 b $28 \pm 20 \%$ ($p \leq 0,05$) und in der Abb. 26 b $10 \pm 5 \%$ ($p \leq 0,05$).

Das Sekretionsmaximum in der Abb. 26a ist im Vergleich zu den anderen beiden signifikant größer ($p \leq 0,05$).

Wie eine Gegenüberstellung der Flächenintegrale bei 20 mM Glucose und 5 mM Theophyllin (= rechte Spalte der Tab. 2 gegen jene der Tab. 4) plus die entsprechenden Ca^{++} -Konzentrationen ersichtlich macht, hat die Prästimulation mit 5 mM Theophyllin gegenüber der mit 20 mM Glucose nur bei 0,5 mM Ca^{++} in der zweiten Sekretionsphase eine stimulatorische Wirkung (Tab. 2, B gg. 4, A, 30. - 50. Minute : 25919 ± 3205 gegen $12956 \pm 733 \mu\text{U}/20 \text{ min}$), ($p \leq 0,005$).

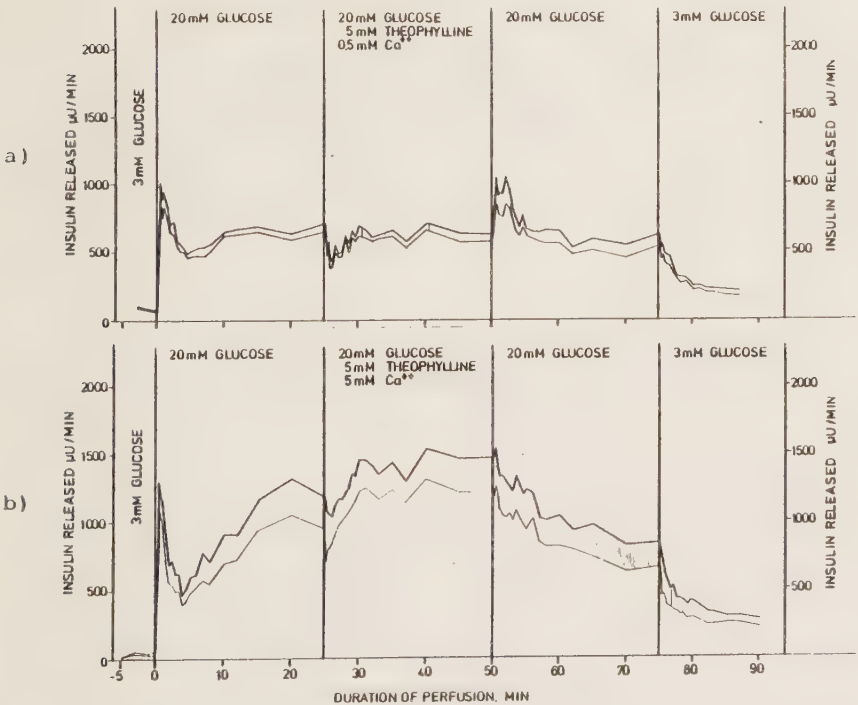


Abb. 26 a-b: Vorperfusion mit 20 mM Glucose und der Einfluß von 0,5 mM Ca^{++} ($n = 5$) und 5 mM Ca^{++} ($n = 6$) auf die zweite Phase der Glucose-induzierten Insulinsekretion bei Anwesenheit von 5 mM Theophyllin (Mittelwertskurven $\pm$ SEM)

Tabelle 4: Vergleiche von Flächenintegralen (=Insulinmengen in U) der Experimente in der Abbildung 26 a,b (A u. C) und der Abbildung 25 b (B).

Experimentelle Bedingungen	Sezerniertes Insulin in μU ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)		Signifikanzniveau Steigerung der Sekretionsrate $\pm \text{SEM}$	
	zweite Phase 5.-25.Min.		zweite Phase 30.-50.Min.	
(Anzahl)	mM		mM	
A (5)	Glucose	20	20	
	Theophyllin	-	5	12956
	Ca ⁺⁺	2,5	0,5	± 733
				N.S.
(6)	Glucose	20	5	
	Theophyllin	-	5	26309
	Ca ⁺⁺	2,5	2,5	± 2926
				$p \leq 0,005$ $140 \pm 48 \%$
C (6)	Glucose	20	20	
	Theophyllin	-	5	29073
	Ca ⁺⁺	2,5	5	± 4236
				N.S. $51 \pm 28 \%$

Vergleiche:

A--B	N.S.	$p \leq 0,005$
A--C	N.S.	$p \leq 0,005$
B--C	N.S.	N.S.

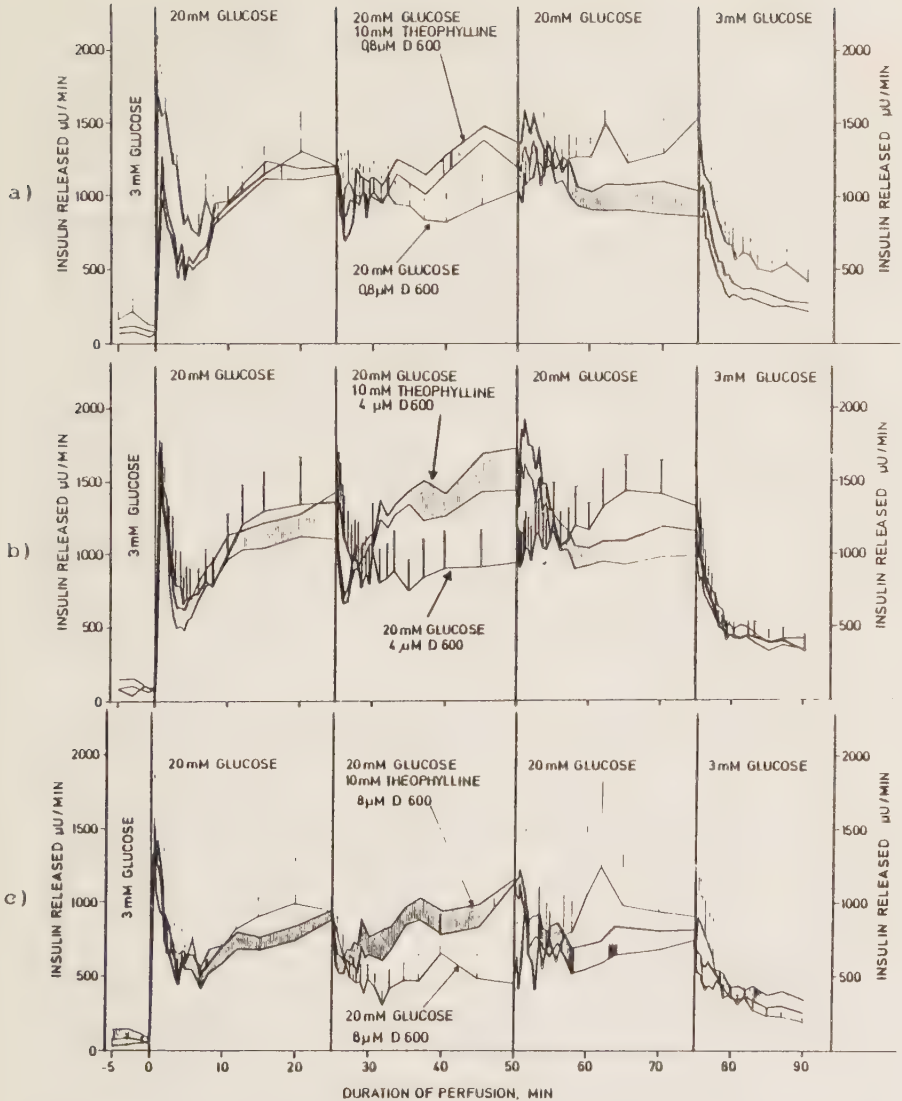


Abb. 27 a - c: Vorperfusion mit 20 mM Glucose und der Einfluß von 0,8 ($n = 4$), 4 ($n = 4$) oder 8 ($n = 3$) μM D 600 allein auf die zweite Phase der Glucose-induzierten Insulinsekretion (= Mittelwertskurven mit den Balken (= $\pm$ SEM)). Respektive desgleichen bei zusätzlicher Anwesenheit von 10 mM Theophyllin ($n = 5$; $n = 6$; $n = 4$; Mittelwertskurven mit den schraffierten Flächen (= $\pm$ SEM))

3.5.3. Der Einfluß von D 600 auf die mit Glucose und Theophyllin induzierte Insulinfreisetzung

Die nach der Vorstimulation mit 20 mM Glucose hinzugefügten 10 mM Theophyllin verursachen bei gleichzeitiger Applikation von 0, 0,8 , 4 oder 8 μM D 600, einem Blocker von transmembranösen Ca^{++} -Kanälen (116), bezogen auf die vorausgehende Sekretionsrate in der 25. Minute, eine vorübergehende Hemmung um $32 \pm 4 \%$ ($p \leq 0,001$, Abb. 25 c), $36 \pm 11 \%$ ($p \leq 0,025$, Abb. 27 a), $50 \pm 4 \%$ ($p \leq 0,005$, Abb. 27 b) und $40 \pm 8 \%$ ($p \leq 0,005$, Abb. 27 c). Gegenüber der Bedingung ohne D 600 wird nur bei 4 μM D 600 die Hemmung signifikant verstärkt ($32 \pm 4 \%$ gegen $50 \pm 4 \%$; $p \leq 0,005$).

Wenn man D 600 (0,8 , 4 oder 8 μM) in der zweiten Phase der Glucose-induzierten Insulinfreisetzung perfundiert, so tritt eine persistierende Hemmung auf (Abb. 27 a-c, 25. - 50. Minute), die bezogen auf die jeweils vorausgehenden Sekretionsraten in der 5. bis 25. Minute $17 \pm 4 \%$, $33 \pm 10 \%$ bzw. $46 \pm 17 \%$ beträgt. Nach dem Entzug von D 600 erholt sich die Insulinausschüttung langsam bis auf das ursprüngliche Niveau (Abb. 27 a-c, 50. - 75. Minute).

10 mM Theophyllin ist in der Lage, abgesehen von der initialen Hemmung (s.o.), diese im weiteren Verlauf aufzuheben (Abb. 27 a-c, 30. - 50. Minute).

Bei 0, 0,8 und 8 μM D 600 wird durch 10 mM Theophyllin von der 30. - 50. Minute ein signifikanter Anstieg des freigesetzten Insulins über dasjenige hinaus erreicht, welches in der Vorstimulation mit 20 mM Glucose von der 5. - 25. Minute sezerniert wird (Tab. 5, Reihe A : $p \leq 0,05$, B : $p \leq 0,05$, D : $p \leq 0,025$). Der analoge Vergleich bei 4 μM D 600 bleibt unter dem Signifikanzniveau (Tab. 5, Reihe C : N.S.).

Wird in den Experimenten der Abbildung 27 a - c sowohl das Theophyllin als auch das D 600 entfernt, so erscheint ein kurzes plötzliches Maximum der Insulinfreisetzung und zwar, bezogen auf die vorausgehende Sekretionsrate in der 50. Minute, eine Steigerung um $19 \pm 6 \%$ ($p \leq 0,025$) bei 0,8 μM , um $20 \pm 7 \%$ ($p \leq 0,025$) bei 4 μM und um $16 \pm 7 \%$ (N.S.) bei 8 μM D 600.

Dem Entzug von Theophyllin ohne D 600 (Abb. 25 c) folgt eine nicht signifikante Erhöhung um $34 \pm 22 \%$.

Die durch 20 mM Glucose und 10 mM Theophyllin von der 30. - 50. Minute sezernierte Menge Insulin ist statistisch gleich der bei zusätzlicher Anwesenheit von D 600 (vgl. Tab. 5 : A--B, A--C, A--D).

Die sequentielle Perfusion mit 20 mM Glucose, 20 mM Glucose plus 5 mM Theophyllin und anschließend noch $4 \mu\text{M}$ D 600 zeigt, außer dem Verlust des plötzlichen Insulinausstoßes nach dem Theophyllinentzug in der 100. Minute, keine wesentliche Änderung des Sekretionsprofils (Abb. 28) gegenüber der sofortigen Anwesenheit von $4 \mu\text{M}$ D 600 in der Glucose-Theophyllin stimulierten Insulinsekretion (Abb. 27 b).

Insbesondere tritt keine hemmende Wirkung von D 600 bei dessen Zusatz in eine Glucose-Theophyllin stimulierte Sekretionsphase auf (Abb. 28, 50. - 75. Minute).

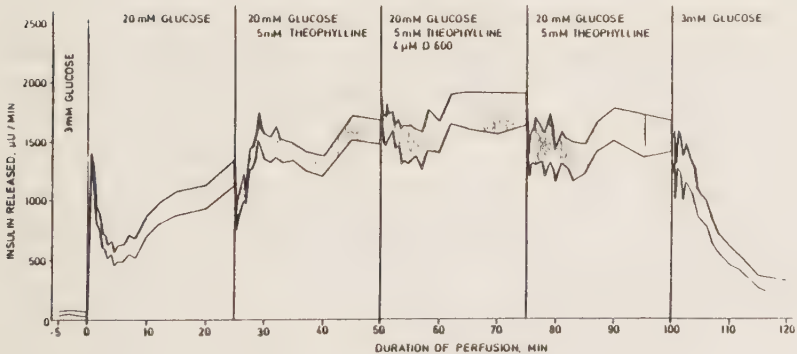


Abb. 28: Der Einfluß von $4 \mu\text{M}$ D 600 auf die zweite Phase der mit 20 mM Glucose und 5 mM Theophyllin stimulierten Insulinsekretion ($n = 7$, Mittelwertskurve $\pm$ SEM)

Tabelle 5: Vergleiche von Flächenintegralen (=Insulinmengen in μU) der Experimente in der Abbildung 25 c (A) und der Abbildung 27 a-c (B, C, D)

Experimentelle Bedingungen (in allen Exp. 2,5 mM Ca ⁺⁺)		Sezerniertes Insulin in μ U ($\bar{x}$ $\pm$ SEM)				Signifikanz- niveau Steigerung der Sekretionsrate $\pm$ SEM
		zweite Phase 5.-25. Min.		zweite Phase 30.-50. Min.		
(Anzahl)	mM					
A (5)	Glucose	20		20		
	Theophyllin	-	19972	10	29108	p $\leq$ 0,05
	-	-	$\pm$ 3750	-	$\pm$ 5501	52 $\pm$ 23 %
B (5)	Glucose	20		20		
	Theophyllin	-	21814	10	26318	p $\leq$ 0,05
	D 600	-	$\pm$ 1426	0,0008	$\pm$ 2479	21 $\pm$ 9 %
C (6)	Glucose	20		20		
	Theophyllin	-	23776	10	30551	N.S.
	D 600	-	$\pm$ 2924	0,004	$\pm$ 3697	36 $\pm$ 19 %
D (4)	Glucose	20		20		
	Theophyllin	-	15772	10	19472	p $\leq$ 0,025
	D600	-	$\pm$ 1929	0,008	$\pm$ 2700	23 $\pm$ 5

Vergleiche:

A--B	N.S.	N.S.
A--C	N.S.	N.S.
A--D	N.S.	N.S.

4. DISKUSSION

4.1 Prostaglandinvorstufen

Die Umwandlung von $(1-^{14}\text{C})$ -Arachidonsäure in PGE_2 und $\text{PGF}_{2\alpha}$ im Rattenpankreas und deren Nachweis ist HAMAMDC21C et al. (55) gelungen, obwohl der von den Pankreasinseln bzw. B-Zellen stammende Anteil ziemlich klein sein dürfte (112). Präparationen von exokrinen, azinären Pankreaszellen weisen die Fähigkeit auf, Arachidonsäure sowohl via Lipoxygenase als auch via Cyclooxygenase zu den entsprechenden Endprodukten zu metabolisieren (153).

Wie schon im Ergebnisteil festgestellt, kommt es bei der Perfusion von 8,11,14- $(1-^{14}\text{C})$ -Eicosatriensäure und $(1-^{14}\text{C})$ -Arachidonsäure zu keinem Abbau bzw. Zerfall der langkettigen, hochungesättigten Fettsäuren, d.h. sie erreichen die B-Zellen in intaktem Zustand.

Ein Umbau in einen weniger stark lipophilen Metaboliten scheint bei der Arachidonsäure stattzufinden, da unmittelbar vor dem Organ der Aktivitätspeak noch ungespalten und danach verbreitert bzw. zweigipflig ist ($B_{1/2}$ in Abb. 9 und 10). Die 8,11,14 Eicosatriensäure wird offensichtlich nicht in wesentlichen Mengen oder nur geringfügig umgebaut.

SAMUELSSON et al. (156) berichten ebenfalls, daß die 8,11,14 Eicosatriensäure in künstlichen Medien wie hier nicht in Prostaglandine metabolisiert wird.

Die in der Einleitung beschriebenen Effekte exogener Prostaglandine sind keine unspezifischen von ungesättigten, langkettigen Fettsäuren, da selbst bis zu $750\text{ }\mu\text{M}$ Ölsäure keine Insulinausschüttung am isolierten, perfundierten Rattenpankreas provoziert (22), (144). In Inselzellkulturen zeigte sich jedoch schon bei $17,7\text{ }\mu\text{M}$ Ölsäure eine stimulierende Wirkung, wogegen gesättigte Fettsäuren keinen Effekt hatten (136). Erhöhte Spiegel an freien (exogenen) Prostaglandinpräkursoren stimulieren die PG-Synthese in Zellen, die über die entsprechenden Enzymsysteme verfügen (187).

Von der Arachidonsäure ist bekannt, daß sie in einer wie auch in den eigenen Experimenten verwendeten Konzentration von $10\text{ }\mu\text{M}$ kein Substrat des Energiestoffwechsels ist, sondern regulative Funktionen ausübt (22). Andererseits schränken Konzentrationen größer als $200\text{ }\mu\text{M}$ die Lebensfähigkeit der B-Zellen deutlich ein (197). Der natürliche Gehalt an den Folgeprodukten PGE_2 und $\text{PGF}_{2\alpha}$ wurde zu 52 pmol bzw. 28 pmol/g Pankreasgewebe von Wistar-Ratten bestimmt (93).

Liegt ^3H -markierte Arachidonsäure in einer Konzentration von $33\text{ }\mu\text{M}$ vor, so wird diese, sowohl bei substimulatorischer, als auch verstärkt bei stimulatorischer Glucosekonzentration in die Membranphospholipide von isolierten Rattenpankreasinseln eingebaut und via Phospholipase A_2 wieder freigesetzt, worauf dann die weitere Metabolisierung folgt (41).

Ob eine Abhängigkeit der Art der Prostaglandinsyntheseprodukte (PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ u./o. $6\text{Keto-PGF}_{1\alpha}$) von der einwirkenden Arachidonsäurekonzentration, wie sie in einer Cyclooxygenase-Präparation aus Samenbläschen von Schafen nachgewiesen wurde (34), auch bei den Langerhansschen Inseln der Fall ist, muß noch geklärt werden.

Aus den Ergebnissen von AKPAN et al. (1) am isolierten, perfundierten Rattenpankreas leiten sich Hinweise ab, daß die endogenen Prostaglandine möglicherweise überhaupt nicht obligatorisch in die normale Funktion der Langerhansschen Inseln eingeschaltet sind. Sie konnten nämlich zeigen, daß Bauchspeicheldrüsen von Ratten, die in Bezug auf die essentiellen Fettsäuren und damit die Prostaglandinvorstufen mangelernährt wurden, auf die üblichen Sekretionsreize (u.a. Glucose) im wesentlichen unverändert antworteten.

Da sowohl 8,11,14 Eicosatriensäure, als auch 11,14,17 Eicosatrien-, Arachidon- oder Eicosapentaensäure bei substimulatorischen 3 mM Glucose keinen Einfluß auf die basale Insulinsekretion ausüben, weist dies in die gleiche Richtung.

AXEN K.V. et al. (9) konnten am isolierten Rattenpankreas ebenfalls keinen Effekt von PG-Präkursoren bei 3 mM Glucose

auf die Insulinsekretion beobachten, weil selbst die endogene Freisetzung von Arachidonsäure aus Phosphatidylinositol erst nach dem Glucose(16,7 mM)-induzierten Ca^{++} -Influx in der Stimulus-Sekretionskoppelung einsetzt. Jedoch scheinen Prostaglandine der E-Serie nach einer längeren Fastenperiode einen tonisch hemmenden Effekt auf die Basalsekretion auszuüben, da sich der Gehalt an diesen Prostaglandinen mehr als verdreifacht (98). METZ et al. (135), (136) berichten über eine stimulierende Wirkung von exogener Arachidonsäure auf die basale und durch Glucose induzierte Insulinsekretion in Inselzellkulturen ab einer Konzentration von 16,4 μM , wobei ein unspezifisch toxischer Effekt ausgeschlossen wurde. Eine Konzentration von 1,64 μM hatte keinen Einfluß auf die Insulinsekretion. Der Widerspruch zu den eigenen Ergebnissen könnte in der höheren Konzentration und in der andersartigen Präparation liegen.

Auch die Sekretionsraten in der zweiten Phase der Glucose-induzierten Insulinausschüttung ändern sich durch das Beifügen der Prostaglandinpräkursoren nicht signifikant (vgl. Tabelle 1).

Hohe Glucosekonzentrationen wie die hier verwendeten bedingen möglicherweise eine Verminderung der PG-Synthese (39). Ferner könnten durch einen Mangel an bestimmten Zusatzstoffen (z.B. reduzierte Glutathione) manche Enzyme der o.g. Kaskaden (z.B. Prostaglandin-Endoperoxid-E-Isomerase) nicht in vollem Umfang zur Wirkung kommen (156).

Die von YAMAMATO et al. (197) an isolierten Rattenpankreasinseln durch größer als 100 μM Arachidonsäure erzielte Insulinfreisetzung wird auf einen zellytischen Effekt bei diesen relativ hohen Konzentrationen zurückgeführt. Eine Nettowirkung von Prostaglandinen dürfte nur dann eintreten, wenn die relativen Konzentrationen der Folge- bzw. Endprodukte der o.g. Stoffwechselwege zueinander gestört sind (112).

Geht man weiterhin von der Tatsache aus, daß in Pankreasinseln ein die Glucose-induzierte Insulinfreisetzung hemmender Stoffwechselweg der Arachidonsäure via Cyclooxygenase und ein

diese stimulierende Weg via Lipoxxygenase existiert (136), so ist trotz Aktivitätssteigerung der Phospholipase A_2 (105), (197) und der Zunahme von Lipoxxygenase-Folgeprodukten (132) kein tiefergreifendes Ungleichgewicht zu erwarten.

Die Ursache für einen fehlenden Einfluß der Arachidonsäure ist z.T. auch darin zu sehen, daß zwar ein instabiles Zwischenprodukt des Lipoxxygenase-Weges, die 12-Hydroperoxyeicosatetraensäure, die Glucose-induzierte Insulinfreisetzung zu potenzieren vermag, jedoch wird dieses durch die in der Glykolyse entstehenden Reduktionsäquivalente zum stabilen, aber wirkungslosen Endprodukt (12-Hydroxyeicosatetraensäure) metabolisiert (135).

Aufgrund der dargestellten Ergebnisse konnte für die Prostaglandinvorstufen im Rahmen der basalen und der Glucose-induzierten Insulinsekretion keine zentrale Bedeutung derselben im Stimulus-Sekretions-Koppelungsmechanismus aufgezeigt werden.

4.2 Äthanol

Verschiedentlich wird über einen Einfluß von Äthanol auf die Insulinsekretion von Ratten (81), (143), (164), (168), (180) berichtet.

Da die Prostaglandinpräkursoren in absolutem Äthanol gelöst dem Perfusionsmedium zugefügt werden (vgl. 2.2.2.7), und folglich eine Überlagerung von Wirkungen auf die Insulinsekretion denkbar ist, wird diese Möglichkeit durch entsprechende Kontrollexperimente überprüft (siehe 3.4).

Der Äthanol erreicht nach der Zumischung eine Endkonzentration von ca. 0,03 Vol%.

Bei einer Äthanolkonzentration von 0,1 Vol% bzw. 0,05 Vol% läßt sich am isolierten, perfundierten Rattenpankreas weder eine Änderung der Basalsekretion bei substimulatorischer noch ein Einfluß auf die mit 20 mM Glucose stimulierte Insulinausschüttung aufzeigen (siehe 3.4).

Am gleichen Versuchsmodell blieb, in Übereinstimmung mit den eigenen Ergebnissen, die Basalsekretionsrate selbst unter dem

Hinzufügen von z.T. höheren Konzentrationen absoluten Äthanol (0,18 Vol% bzw. 1 Vol%) unverändert (144), (180). Jedoch wurden beide Phasen der Glucose(11,1 mM)-induzierten Insulinsekretion in der Studie von TIENGO et al. (180) in Abhängigkeit von der Äthanolkonzentration gesenkt. Die Erklärung für diese Diskrepanz zu den eigenen Ergebnissen dürfte in der nicht maximalen Insulinantwort durch 11,1 mM Glucose liegen und vielleicht auch in dessen jeweils 40 Minuten langen Vorperfusionen mit Äthanol bei substimulatorischer Glucose.

Gleichzeitige Perfusion von isolierten Rattenpankreasinseln mit 16,7 mM Glucose und 0,39 Vol% bzw. 0,13 Vol% Äthanol verursacht bei höheren Äthanolkonzentrationen eine deutliche Hemmung beider Phasen der Glucose-induzierten Insulinfreisetzung, während bei 0,13 Vol %, einer Konzentration, die den eigenen Äthanolkonzentrationen nahekommt, sich keine Änderung der Insulinsekretion zeigt (168).

In dieser Studie löste eine Vorperfusion mit 0,13 oder 0,39 Vol% Äthanol keinen Effekt auf die folgende Insulinantwort aus.

Im Gegensatz dazu fanden HOLLEY, D.C. et al. (81) am isolierten, perfundierten Rattenpankreas schon bei 0,13 Vol% Äthanol eine Erniedrigung der Glucose-induzierten Insulinausschüttung in der zweiten Phase, wogegen 1,3 Vol% beide Phasen hemmte. Die aufgezeigten Ergebnisse zusammengefaßt verdeutlichen, daß die beiden Phasen der Glucose-induzierten Insulinantwort in Abhängigkeit von der Äthanolkonzentration gehemmt werden können, dies aber auch vom Ausmaß des Stimulationsreizes, d.h. der Glucosekonzentration, mitbestimmt wird.

Die Äthanol-Endkonzentration lag bei 0,03 Vol% in den Experimenten mit den Prostaglandinvorstufen.

Eine Interferenz des Äthanol auf die Effekte der Prostaglandinvorstufen läßt sich damit weitgehend ausschließen.

4.3 Theophyllin

1,3 Dimethylxanthin mit der Kurzbezeichnung Theophyllin wie auch die Derivate IBMX (= 3-Isobutyl-1-Methylxanthin) (58), Theobromin (21) und Coffein (21), (44) sind potente, kompetitive Hemmer vor allem der partikelgebundenen Phosphodiesterase (21), (155), (165), welche cAMP zu 5'AMP inaktiviert. Theophyllin ist daher in der Lage, die intrazelluläre Konzentration von cAMP zu erhöhen (119), (175), (181). Glucose beeinträchtigt die Phosphodiesteraseaktivität nicht (122). Zu einer exzessiven Insulinfreisetzung kommt es jedoch nur, wenn die B-Zellen gleichzeitig oder jemals vorher mit Glucose inkubiert waren (49), d.h. eine cAMP-Erhöhung allein ist unzureichend.

Von den im obigen Modell beschriebenen Hauptwirkungen des cAMP, nämlich die Aktivierung der Proteinkinase mit Folgereaktionen und die Hemmung der Ca^{++} -ATPase der Zellorganellmembranen, trägt vor allem die letztere zur Erhöhung des intrazellulär frei ionisierten Kalziums bei (18), (19), d.h. Kalzium wird dadurch Glucose-unabhängig vom Zellorganellen in den Cytoplasma-Pool umverteilt (19), (167).

Selbst bei hohen Konzentrationen von Glucose wird dessen Metabolismus durch Theophyllin nicht beeinflusst (5), jedoch können Methylxanthine den Glucosetransport in die Zelle (129) hemmen, was aber ohne Folgen bleibt, da dies nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist.

Neben der indirekten, cAMP-vermittelten Hemmung der Ca^{++} -ATPase (57) durch Methylxanthine haben letztere auch eine direkte, cAMP-unabhängige, hemmende Wirkung auf die ATP-abhängige Ca^{++} -Aufnahme (171) in Mitochondrien (17), (52) und Sekretgranula.

Auch ASHCROFT et al. (7) kamen zu dem Schluß, daß Methylxanthine unabhängig von den Auswirkungen der Hemmung der Phosphodiesterase zusätzlich direkt die Ca^{++} -Aufnahme in die Mitochondrien herabsetzen.

4.3.1 Der Theophyllineinfluß bei 2,5 mM Ca^{++}

Die potenzierende Wirkung von Theophyllin auf die Glucose- (oder durch andere Stimuli)-induzierte Insulinsekretion ist die Erhöhung der intrazellulären Ca^{++} -Konzentration (19), (104), (119). Bei hohen Theophyllinkonzentrationen von 5 mM bis 10 mM kann es auf diese Weise auch ohne Glucose zu einer relativ geringen Insulinfreisetzung kommen (18), (70), (104). Obwohl 5 mM Theophyllin über der von METZ et al. (134) und SOMERS et al. (169) bei niedrigen Glucosekonzentrationen zu 1,4 mM als der sicher substimulatorisch wirkenden Theophyllinkonzentration liegt, wird nur eine unwesentliche oder keine Erhöhung der basalen Insulinsekretion in der Präperfusionsphase festgestellt, was auch in Einklang mit LANDGRAF et al. (101), LANDGRAF-LEURS et al. (104), BRISSON et al. (19), LENZEN et al. (110) und CHARLES et al. (29) steht (vgl. Abb. 24 a-c).

Die potenzierende Wirkung von 5 mM Theophyllin (29) kann sowohl für die erste als auch für die zweite Phase der Glucose-induzierten Insulinsekretion bestätigt werden (Tab. 2). Dieser Steigerungsgrad wird durch Zugabe von sowohl 2 mM Theophyllin, das allein substimulatorisch ist (70), als auch von 5 mM und 10 mM Theophyllin in die laufende zweite Phase der Glucose-induzierten Insulinsekretion nicht ganz erreicht (Tab. 3)

5 mM Theophyllin stellt sich unter diesen Bedingungen, in Übereinstimmung mit METZ et al. (134), als am stärksten potenzierend heraus (Tab. 3, B : $140 \pm 48 \%$).

MALAISSSE et al. (119) erhielten bei Exposition von isolierten Rattenpankreasinseln in 1,4 mM Theophyllin und hohen Glucosekonzentrationen praktisch dieselben Ergebnisse. Stimulatorische Konzentrationen von Glucose erhöhen, wie im Modell erläutert, erst sekundär nach dem Anstieg des cytosolisch freien Ca^{++} via Ca^{++} -Calmodulin-abhängiger Adenylat-Cyclase (166) die cAMP Konzentration (74), (117), (201), die wiederum im Sinne eines "feed-forward" das cytosolische Ca^{++} weiter ansteigen läßt (29).

Die Folge davon ist ein gesteigerter Ca^{++} -Efflux, der die initiale Effluxhemmung überdeckt (114).

Obwohl Theophyllin ohne Glucose durch die Hemmung der cAMP-inaktivierenden Phosphodiesterase die intrazelluläre Konzentration von cAMP noch stärker zu erhöhen vermag wie die Glucose allein (29), ist keine oder nur eine geringe Insulinfreisetzung zu beobachten (104), (119), (165).

In diesem Fall wirkt zwar das gebildete cAMP im Sinne einer Erhöhung des cytosolisch frei gelösten Ca^{++} , aber dieses entkommt der B-Zelle transmembranös (18) und bedingt somit den Theophyllin-induzierten, je nach Konzentration, mäßig (108) bis starken Anstieg des Ca^{++} -Efflux (18), (19), (119), ohne dessen Aufnahme in die Zelle zu beeinflussen (19), (65).

HAHN et al. (52) fanden sogar keinerlei Einfluß von Theophyllin auf die intrazelluläre Kalziumverteilung bei Anwesenheit von Glucose. Dagegen stehen die Ergebnisse von LENZEN et al. (110), wonach 5 mM Theophyllin die Ca^{++} -Niederschläge an der inneren Oberfläche der B-Zellmembranen vermindert und die Präzipitate im Cytoplasma vermehrt sind.

Erst bei Anwesenheit von stimulatorischer Glucose wird nun dieser Ca^{++} -Efflux teilweise gehemmt, und/oder hohe Glucosekonzentrationen determinieren die Effluxrate gar vollkommen unabhängig vom Theophyllin (77), so daß aufgrund der synergistischen Wirkung dieser beiden Substanzen auf die cAMP- und damit auf die cytolische Ca^{++} -Konzentration eine potenzierte Insulinsekretion die Folge ist.

Würde eine Präperfusion mit Theophyllin ohne Glucose eine stärker anhaltende Akkumulierung des cytosolischen Ca^{++} bringen als eine Präperfusion mit Glucose, so müßte die Insulinsekretion im ersteren Fall kleiner werden beim Erreichen einer hemmend wirkenden Ca^{++} -Konzentration oder größer, wenn das Ca^{++} -Optimum noch nicht wirksam war (weitere Erklärung s.u.). Dies konnte in unseren Experimenten nicht gefunden werden.

Gibt man zur zweiten Phase der Glucose-induzierten Insulinsekretion Theophyllin, so ist initial während der ersten Minuten eine vorübergehende signifikante Hemmung zu beobachten, die in die Phase der oben beschriebenen Potenzierung übergeht (Abb. 25 a-c).

Eine Beziehung zur cAMP- und intrazellulären Ca^{++} -Verteilung ist wahrscheinlich, weil diese hauptsächlich die zweite Phase der Glucose-induzierten Insulinsekretion steuern (15), (70). Da die Prästimulation mit 20 mM Glucose schon zu einer Erhöhung des cytosolischen Ca^{++} und zu einer Nettoaufnahme dessen vor allem in die B-Zell-Sekretgranula und Mitochondrien führt (15), (160), ist es denkbar, daß die via Theophyllinwirkung akut erhöhte cAMP-Konzentration durch die Hemmung der Ca^{++} -ATPase (44) das cytosolische Kalzium vorübergehend derart bis an eine kritische Schwelle (eventuell ein hemmend wirkendes Maximum) ansteigen läßt und die am Sekretionsprozess beteiligten Ca^{++} -empfindlichen Enzymsysteme inaktiviert, bis sich ein neues Ca^{++} -Austausch-Gleichgewicht eingestellt hat.

Ein Ausdruck dieser kurzzeitigen exzessiven Ca^{++} -Erhöhung im Cytosol könnte der von BRISSON et al. (18) drei bis vier Minuten nach Zugabe von Theophyllin beobachtete maximale Ca^{++} -Efflux sein.

HELLMAN (58) folgert aus seinen Daten, daß nicht nur eine Erniedrigung, sondern auch eine Erhöhung des funktionell wichtigen intrazellulären Ca^{++} -Pools in einer verminderten Ansprechbarkeit auf Glucosestimulation enden könnte. Die Adenylat-Cyclase (24), (119), (165) und Proteinkinase (189) werden tatsächlich durch hohe intrazelluläre Ca^{++} -Konzentrationen (10^{-5} - 10^{-4} M freies Kalzium), (57) teilweise gehemmt.

Andererseits ist es auch möglich, daß Enzyme durch diesen Ca^{++} -Exzess erst aktiviert werden, wie z.B. die Phosphodiesterase durch Ca^{++} -Calmodulin (179) und die Phosphoproteinphosphatase (165), die die Wirkung von Proteinkinasen (siehe Modell) antagonisiert und die Insulinsekretion damit beein-

trächtigen könnte (evtl. eine "feed-back" - Hemmung zum Schutz vor akuter Degranulation der B-Zellen bei Ca^{++} -Überschuß).

In vitro Versuche von WEISENBERG et al. (188) konnten bei ansteigenden Kalziumkonzentrationen eine Depolymerisierung von wachsenden Mikrotubuli zeigen, was eine Behinderung des Exozytoseprozesses vor allem in der zweiten Phase zur Folge haben könnte.

Ob ein von HELLMANN (58) vermuteter unspezifisch membran-stabilisierender Effekt von Kalzium eine Rolle spielt, ist ungewiß.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß Theophyllin in der zweiten Phase der Glucose-induzierten Insulinfreisetzung initial Prozesse in Gang setzt, die die cytosolische Ca^{++} -Konzentration in einen hemmenden Bereich bringen, der in der folgenden Phase der Potenzierung wieder verlassen wird.

Der Entzug von Theophyllin aus der zweiten Phase der Glucose-induzierten Insulinsekretion löst nach Gabe von Theophyllin einen initialen, kurzen Anstieg der Sekretion aus (sog. "Off-Effekt"), (101).

Da trotz der vorausgehenden Potenzierung der Insulinausschüttung noch eine weitere Steigerung möglich ist, bewirkt anscheinend der Einsatz von Theophyllin zunächst einen akuten Anstieg des cytosolisch freien Ca^{++} auf ein Maximum im Bereich der Hemmkonzentration (initialer Abfall und dann Potenzierung, s.o.) und nicht auf ein darunter liegendes Optimum, das erst nach Theophyllinentzug durchschritten wird.

Durch die Reaktivierung der Phosphodiesterase nimmt die cAMP-Konzentration ab, und damit tritt eine Enthemmung der granulagebundenen Ca^{++} -ATPase (44) ein, die das Zellorganellen-gebundene Kalzium (z.B. in Sekretgranula (160)) erhöht.

Dies bewirkt eine Umverteilung und Senkung des cytosolischen Kalziums vom Maximum der Potenzierungsphase vorübergehend zum Optimum der Off-Effekt-Phase.

Je geringer die unmittelbar vorausgehende extrazelluläre Kal-

ziumkonzentration ist, desto größer ist der prozentuale Anstieg des Off-Effekts, d.h. die cytosolische Kalziumkonzentration und die Verteilung in den Zellorganellen ist bei kleineren extrazellulären Ca^{++} -Konzentrationen länger im Bereich des Optimums. Dies unterstützt die Ergebnisse von HELLMANN (58), die zeigen, daß Phosphodiesteraseinhibitoren das extrazelluläre Ca^{++} -Optimum nach geringeren Konzentrationen hin verschieben.

Bemerkenswert ist, daß der Entzug von Theophyllin nach einer sich an die Glucose-Theophyllin induzierte Insulinsekretion anschließende Phase alleiniger Theophyllinperfusion einen Off-Effekt auslöst.

Ein vorübergehender Kontakt mit Glucose scheint aber notwendig zu sein, da LANDGRAF-LEURS et al. (104) keinen Off-Effekt bei ausschließlicher Perfusion mit Theophyllin gefunden haben. Ebenso verursacht Phenylalanin (5 - 20 mM) einen Off-Effekt nur bei substimulatorischen Glucosekonzentrationen (103). Der Off-Effekt ist also nicht allein dem Theophyllinentzug zuzuschreiben, sondern es müssen begünstigende Zusatzbedingungen erfüllt sein. Dies scheint auch bei einer Vorbehandlung mit 5 mM Ca^{++} nicht mehr der Fall zu sein, da hier der Off-Effekt fehlt. Der Off-Effekt kann aber dennoch als für Theophyllin spezifisch angenommen werden und ist keine Folge des beim Umschalten auftretenden, abrupten Abfalls der Osmolarität, der bei BLACKARD, W.G. et al. (14) beim Übergang von 20 mM auf 3 mM Glucose mit einer Off-Antwort begleitet wurde, da der Off-Effekt auch ohne Glucose-bedingten Osmolaritätssprung auftritt. Den sich an eine Phase mit alleiniger Theophyllinperfusion anschließenden Off-Effekten dürfte im Gegensatz zu denen einer Potenzierungsphase folgenden ein anderer intrazellulärer Mechanismus zugrunde liegen, da der ersterwähnte Anstieg von annähernd basalen Insulinspiegeln ausgeht. Zusammenfassend läßt sich zum Off-Effekt sagen, daß er in seinem Ausmaß von der vorausgehenden Theophyllinkonzentration (2 mM - 10 mM) unabhängig und von der vorhergehenden Ca^{++} -Konzentration und dem Kontakt zur Glucose abhängig ist.

4.3.2 Der Theophyllineinfluß bei 0,5 und 5 mM Ca^{++}

Zunächst werden diejenigen Versuche diskutiert, in denen eine Präperfusion mit 5 mM Theophyllin durchgeführt wurde. Eine Erniedrigung des extrazellulären Kalzium auf 0,5 mM während der Glucose-Theophyllin-induzierten Insulinsekretion läßt im Vergleich zu 2,5 mM keinen Unterschied erkennen, jedoch hat die Erhöhung auf 5 mM eine Verminderung der Potenzierung in beiden Phasen zur Folge.

MILNER und HALES (137) fanden eine Hemmung der Glucose-induzierten Insulinfreisetzung durch hohe extrazelluläre Ca^{++} -Konzentrationen (> 2 mM). 5,12 mM hemmt, wenn auch nicht signifikant, die Glucose-induzierte Insulinsekretion, läßt aber die cAMP-Konzentration in der Zelle unberührt (29), (58). Es ist denkbar, daß der Theophyllin-induzierte Ca^{++} -Efflux durch ansteigende extrazelluläre Kalziumkonzentrationen durch einen membranstabilisierenden Effekt (58) behindert wird (18).

Da zusätzlich die Glucose-induzierte Ca^{++} -Aufnahme parallel mit der extrazellulären Ca^{++} -Konzentration steigt (68), (122), könnten sich beide Effekte derart addieren, daß sich das cytosolische Kalzium einer Hemmschwelle für die in die Insulinfreisetzung eingeschalteten Enzymsysteme nähert, was offensichtlich bei 0,5 mM Ca^{++} nicht der Fall ist.

Zur letzteren Tatsache ist zu sagen, daß eine Erniedrigung des extrazellulären Kalziums unter 2,5 mM, welche die optimale Konzentration im Perfusionsmedium darstellt (73), die Glucose-induzierte Insulinsekretion zwar senkt, jedoch wird diese bei Anwesenheit eines Phosphodiesterase-Inhibitors zu kleineren extrazellulären Kalziumkonzentrationen hin verschoben (178) und somit können sich diese beiden gegensinnig wirkenden Effekte möglicherweise derart ausgleichen, ohne eine Abnahme der Insulinsekretion hervorzurufen (58), (59).

MILNER und HALES (137) konnten in vitro bei Kaninchenpankreas eine Ca^{++} -Abhängigkeit des Membranpotentials finden, mit dem Ergebnis, daß eine Verdoppelung des extrazellulären Kalziums

(wie im eigenen Versuch) die Insulinsekretion deutlich senkt. Einen weiteren, indirekten Hinweis auf die Hemmung der Insulinfreisetzung durch hohe intrazelluläre Kalziumkonzentrationen stellen die Ergebnisse von KANATSUKA, A. et al. (92) dar, der bei 7,5 mM Ca^{++} im Extrazellulärraum und Anwesenheit eines künstlichen Ca^{++} -Ionophoren eine deutliche Verminderung der Insulinantwort erhielt.

Im folgenden werden nun die Experimente diskutiert, in denen eine Präperfusion mit 20 mM Glucose voranging (Abb. 26 a, b und Abb. 25 b).

Gleichzeitiges Dazugeben von 5 mM Theophyllin in die zweite Phase der Glucose-induzierten Insulinsekretion und Senken der Ca^{++} -Konzentration auf 0,5 mM oder Verdoppeln auf 5 mM ruft in beiden Fällen (Abb. 26 a,b) eine initiale Hemmung hervor, die verglichen mit 2,5 mM Ca^{++} (Abb. 25 b) sichtbar stärker ist.

Für diese Theophyllin-induzierte initiale Hemmung in der zweiten Phase der Glucose-induzierten Insulinsekretion gilt im wesentlichen das schon unter Punkt 4.3.1 besprochene, jedoch wurde dort durch Konstanthalten des extrazellulären Kalziums auf 2,5 mM keine Änderung des Ca^{++} -abhängigen Membranpotentials provoziert.

Die hier beobachtete verstärkte initiale Hemmung der Insulinsekretion könnte Ausdruck einer Alteration des Membranpotentials durch sprunghafte Änderung der extrazellulären Kalziumkonzentrationen sein.

Die auf die Hemmung folgende Phase der Potenzierung wird bei 0,5 mM Ca^{++} völlig unterdrückt und ist auch bei 5 mM Ca^{++} nicht signifikant erhöht (Tab. 4). Durch die Vorstimulation mit 20 mM Glucose hat die B-Zelle anscheinend die Fähigkeit verloren, sich veränderter extrazellulärer Kalziumkonzentrationen bei gleichzeitiger Theophyllinapplikation anzupassen und eine für die Potenzierung der Insulinsekretion notwendige

neue intrazelluläre Äquilibrierung der Kalziumverteilung vorzunehmen.

WOLLHEIM et al. (192) erhielten in der zweiten Phase bei 0,1 mM Ca^{++} und 16,7 mM Glucose, jedoch ohne Methylxanthinzusatz, sogar eine Hemmung der Insulinsekretion um 83 %. Es ist wichtig für die untenstehenden Folgerungen festzuhalten, daß Glucose-Präperfusion bereits Kalzium durch Effluxhemmung intrazellulär akkumuliert (19), (114) und Theophyllin die Kalziumaufnahme bei hohen Glucosekonzentrationen nicht beeinträchtigt (19), (65).

Bereits 16,7 mM Glucose depolarisiert die B-Zellmembran (5) und läßt einen schnellen Ca^{++} -Influx (118) mit einer Insulinsekretion folgen (120), die durch Entfernung des extrazellulären Kalziums und dadurch bedingter Repolarisation stark gesenkt wird (74).

Ohne extrazelluläres Kalzium kann die fehlende Glucose-induzierte Insulinantwort nur zum Teil von Theophyllin ausgeglichen werden (19), obwohl Theophyllin die intrazelluläre cAMP-Konzentration unabhängig von der extrazellulären Kalziumkonzentration erhöht (29). Übereinstimmend damit steht die Tatsache, daß extrazelluläres Ca^{++} zur Glucose-bedingten cAMP-Erhöhung notwendig ist (29), jedoch nur stimulatorische Glucosespiegel (28), (201), nicht aber basale (28), können den cAMP-Gehalt der B-Zellen anheben.

Trotzdem im eigenen Experiment die extrazelluläre Ca^{++} -Konzentration nur auf ein Fünftel gesenkt wurde, ist eine teilweise Repolarisation der B-Zellmembran denkbar, die die transmembrösen Ca^{++} -Kanäle mehr oder minder schließt. Einen Hinweis auf diese Vermutung bietet die Tatsache, daß die Wegnahme von extrazellulärem Kalzium die initiale Effluxabnahme erhält, wogegen die folgende Effluxzunahme ausbleibt (114). Dies führt nun durch die Ca^{++} -Nettoaufnahme in der Vorperfusion, gleichzeitige Theophyllinwirkung und Membranpotentialänderung zu einer noch exzessiveren, cytosolischen Kalziumerhöhung, was sich in der verstärkten initialen und dann persistierenden Hemmung ausdrückt.

Dieses hohe cytosolische Ca^{++} -Maximum während der persistierenden Hemmung müßte also noch größer wie das unter einer vergleichbaren potenzierenden Phase sein. Unterstützt wird diese Hypothese durch den verhältnismäßig großen, breiten Off-Effekt, der durch ein längeres Verweilen der intrazellulären Ca^{++} -Konzentration im Optimumbereich bedingt ist, weil dieses aus dem Maximumabbau gespeist wird.

Die Präperfusion mit Theophyllin (Abb. 24 a-c) bringt, verstärkt durch die fehlende Glucose-bedingte Ca^{++} -Effluxhemmung, durch den ausgelösten Ca^{++} -Ausstrom (18) und das Nichtzustandekommen der Ca^{++} -Aufnahme (19), (65) insgesamt eher eine Verarmung der B-Zelle an diesem Kation mit sich. Anders gesagt, eine durch Senkung der extrazellulären Ca^{++} -Konzentration auf 0,5 mM hervorgerufene Repolarisation hat hier nicht die oben beschriebene suppressive Wirkung auf die Potenzierung, wie auch das Experiment bestätigt (Tab. 2, A--B).

Bei der plötzlichen Ca^{++} -Erhöhung auf 5 mM gilt im wesentlichen das unter Punkt 4.3.1 Diskutierte.

Dort wurde bei Theophyllinpräperfusion eine signifikante Potenzierung ausgelöst, die jedoch hier nach Präperfusion mit Glucose nicht erreicht wird (Tab. 4). Dies spricht für die Hypothese, daß Glucosepräperfusion insgesamt die Ca^{++} -Konzentration im Cytosol und in den Zellorganellen erhöht, wodurch Theophyllin über einen Ca^{++} -Maximalspiegel eine stärkere Hemmung der Insulinsekretion hervorruft.

4.4 D 600

Neben den Ca^{++} -Antagonisten Verapamil (109), (169), R 33711 und anderen (196) konnte mit D 600 (70), (74), (109), (116) eine weitere spezifisch den Ca^{++} -Influx durch Blockade der Ca^{++} -Kanäle (43), (74) und damit auch die Glucose-induzierte Insulinsekretion hemmende Substanz gefunden werden.

Der Ca^{++} -Efflux wird von D 600 nicht modifiziert (116), wogegen bei Messung von Glucose-induzierten B-Zellmembran-Potentialen an der Maus eine Senkung der De- und Repolarisationsraten festgestellt werden konnte (149).

Ein Vergleich der Kurvenprofile von Glucose plus D 600 mit denjenigen, wo zusätzlich noch Theophyllin beigefügt wurde (Abb. 27 a-c), zeigt, daß Theophyllin ungeachtet der Hemmwirkung von D 600 sein Sekretionsmuster durchsetzt und die initiale Hemmung, die Potenzierung und den Off-Effekt beibehält. 4 μM D 600 erweist sich unter diesen Bedingungen als die Konzentration, bei der die initiale Hemmung signifikant stärker und die Potenzierung signifikant schwächer gegenüber 0,8 μM und 8 μM ist.

Die von HENQUIN et al. (75) gefundene Dosisabhängigkeit (1-50 μM D 600) der Hemmung der Glucose-stimulierten Insulinsekretion kann bestätigt werden.

Diese Daten bekräftigen, daß die zweite Phase der Glucose-induzierten Insulinsekretion zwar extrazelluläres Ca^{++} benötigt (63), (persistierende Influxhemmung durch D 600 senkt die Insulinsekretion), Theophyllin diesen Mangel an Ca^{++} -Influx jedoch durch die oben erläuterten Mechanismen der raschen Umverteilung (116) von intrazellulärem Kalzium mehr als ersetzen kann (18), (19).

Addition von Ca^{++} -Antagonisten hat denselben Effekt wie Entzug des extrazellulären Kalziums, nämlich Hemmung der Insulinsekretion, aber beides kann durch Theophyllin, wenn auch in manchen Fällen nur zum Teil, verhindert werden (19), (70), (75). Umgekehrt führt eine Steigerung der transmembrösen Ca^{++} -Permeabilität durch künstliche Ionophoren selbst bei

stark erniedrigtem extrazellulärem Ca^{++} zu einer Insulinausschüttung (29), (92), (189).

Ein weiteres Zeichen der Unbeeinflussbarkeit der intrazellulären Theophyllinmechanismen, speziell in der Potenzierung, spiegelt die Tatsache wieder, daß die Zugabe von D 600 in diese Phase keine Wirkung zeigt (siehe Abb. 28), (116).

Die von SOMERS et al. (169) mit Verapamil am isolierten, perfundierten Rattenpankreas erhaltenen Ergebnisse stimmen mit den eigenen im wesentlichen überein.

Nachdem die erste Phase der Glucose-induzierten Insulinsekretion unbedingt extrazelluläres Kalzium benötigt, hängt die zweite Phase, wie diese Ergebnisse bestätigen, mehr von der intrazellulären Ca^{++} -Verteilung zwischen Cytosol und Zellorganellen ab (70).

4.5 Schlußfolgerungen aus den Punkten 4.1 bis 4.4

Nachdem allgemein anerkannt (vgl. Übersichtsartikel: (141), (177), (179)) ist, daß ein Anstieg der Konzentration des intrazellulären freien Kalziums und dessen Verteilung in den Zellkompartimenten entscheidende Schritte des Insulinfreisetzungsprozesses darstellen, erörtert HEDESKOV (57), gestützt auf zahlreiche Befunde verschiedener Autoren, die mögliche Rolle von erhöhtem, intrazellulärem freiem Kalzium als Hemmer der Insulinsekretion in einer Art "feed-back"-Kontrollmechanismus.

Auch SHARP et al. (166) weisen in diesem Sinne darauf hin, daß die intrazelluläre Ca^{++} -Konzentration für eine größtmögliche Aktivität der Adenylat-Cyclase zwischen zwei kritischen Konzentrationen gehalten werden muß.

MALAISSÉ et al. (122) und WOLLHEIM et al. (191) sehen in der biphasischen Glucose-induzierten Insulinfreisetzung eine Widerspiegelung eines dazu parallelen, biphasischen, cytosolischen Kalziumkonzentrationsanstieges.

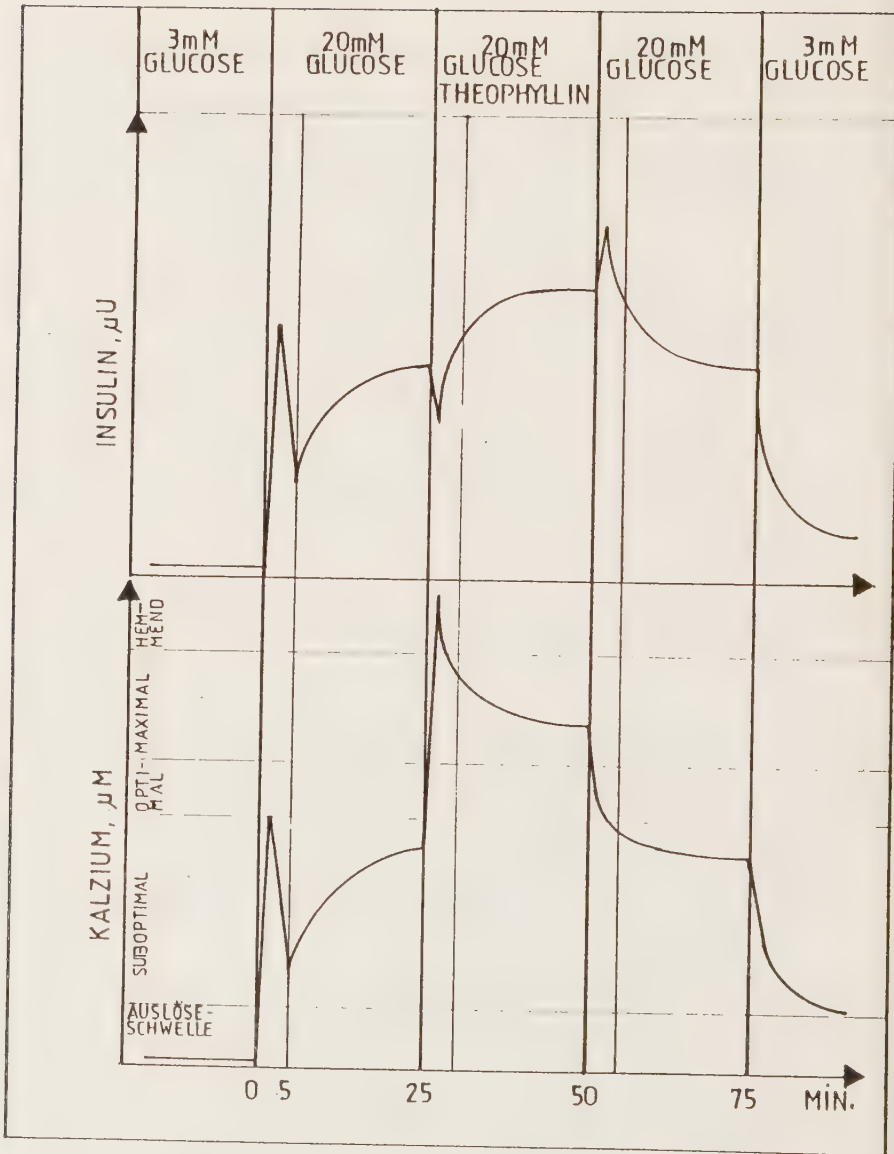


Abb. 29: Schematische Darstellung des hypothetischen, qualitativen, cytosolischen Kalziumkonzentrationsverlaufes in den B-Zellen der Langerhansschen Inseln in Beziehung zu den Phasen der Insulinsekretion

Mittels Phosphodiesterasehemmern ist man in der Lage, via cAMP, das cytosolisch freie Kalzium darüber hinaus zu erhöhen. Neben den bereits genannten Effekten von Theophyllin konnten keine unmittelbaren Auswirkungen auf die Prostaglandinsynthese festgestellt werden (134).

Aus dem Ausmaß der Änderung der Glucose-induzierten Insulinsekretion durch Theophyllin kann man nun, wenn auch in weiten Grenzen, indirekt auf den cytosolischen Kalziumkonzentrationsverlauf extrapolieren.

Zu berücksichtigen ist, daß die Auswirkungen von Theophyllin in hohem Maße von der Abfolge und der Art und Weise der Prästimulation abhängig sind (104). Die Theophyllin-bedingte Modifizierung der zweiten Phase der Glucose-induzierten Insulinantwort in der Reihenfolge Hemmung, Potenzierung und Off-Effekt hat möglicherweise eine cytosolische Kalziumkonzentration in einem hemmenden, maximalen und optimalen Bereich mit als Ursache, wobei die extrazelluläre Kalziumkonzentration nicht ohne Einfluß ist.

Im Gegensatz dazu fanden SOMERS et al. (169) mit 1,4 mM Theophyllin nur ein monophasisches Antwortmuster.

Da es Theophyllin aus den bereits oben aufgeführten Gründen möglich ist, die cytosolische Ca^{++} -Konzentration zu erhöhen, ist ein Anstieg in einen hemmenden Bereich wahrscheinlicher als Ursache für die initiale Insulinsekretionsverminderung als ein Abfall des cytosolischen Kalziums in die Nähe oder unter die Auslöseschwelle.

Der Off-Effekt bei Theophyllinentzug, einhergehend mit einem Ca^{++} -Abfall im Cytosol, könnte ein Ausdruck dafür sein, daß das cytosolische Ca^{++} in der vorausgehenden Hemmungs- und Potenzierungsphase über dem des Off-Effekts liegt, d.h. das Ca^{++} -Optimum müßte hiervon darunter liegen.

Die Ergebnisse aus den Experimenten mit den Prostaglandinpräkursoren erlauben in diesem Zusammenhang keine weiteren Aufschlüsse über deren Rolle im Stimulus-Sekretions-Koppelungsmodell.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit enthält Studien über die Beeinflußbarkeit der Glucose-stimulierten Sekretionskinetik von Insulin am isolierten, perfundierten Pankreas der Ratte.

In Vorversuchen wird die chemische Stabilität der Prostaglandinpräkursoren unter diesen Versuchsbedingungen anhand der 8,11,14-(1- ^{14}C)-Eicosatriensäure und der (1- ^{14}C)-Arachidonsäure nachgewiesen. Die dargestellte, geringe Trägheit des Perfusionssystems erlaubt aussagefähige Rückschlüsse auf die Kinetik der Insulinsekretion.

Die Prostaglandinpräkursoren 8,11,14 Eicosatrien-, 11,14,17 Eicosatrien-, Arachidon- und Eicosapentaensäure zeigen in einer Konzentration von 10^{-5}M weder einen Effekt auf die basale noch auf die Glucose-induzierte Insulinsekretion. Ebenso ist 0,1 Vol. % bzw. 0,05 Vol. % Äthanol ohne Einfluß.

Präperfusion mit 5 mM Theophyllin führt zu einer Verdoppelung beider Phasen der (20 mM) Glucose-induzierten Insulinfreisetzung bei 0,5, 2,5 und 5 mM Kalzium. Der Entzug von Theophyllin verursacht bei 0,5 und 2,5 mM Ca^{++} einen kurzzeitigen Anstieg der Insulinsekretion, aber nicht bei 5 mM Ca^{++} .

Dem Hinzufügen von 2, 5 oder 10 mM Theophyllin in die zweite Phase der Glucose-stimulierten Insulinsekretion folgt dosisunabhängig zunächst eine vorübergehende Hemmung, dann eine Phase der Potenzierung und schließlich nach dem Entzug von Theophyllin wiederum ein kurzzeitiger Insulinausstoß.

Eine Erhöhung der extrazellulären Ca^{++} -Konzentration auf 5 mM verändert die Theophyllinwirkungen nicht, jedoch bringt die Erniedrigung auf 0,5 mM die Potenzierungsphase zum Verschwinden.

D 600, ein Blocker von transmembranösen Ca^{++} -Kanälen, hemmt die Glucose-induzierte Insulinsekretion anhaltend und dosisabhängig (0,8 - 8 μM D 600).

Die gleichzeitige Anwesenheit (oder eine Vorperfusion) von 10 mM Theophyllin hebt diese Wirkung auf und setzt das o.g. Sekretionsmuster von Theophyllin durch.

Diese Ergebnisse werden am gegenwärtigen, biochemisch-physiologischen Modell der Stimulus-Sekretions-Koppelung diskutiert.

Den Prostaglandinpräkursoren kommt unmittelbar keine zentrale Bedeutung im Insulinfreisetzungsprozeß zu. Im Gegensatz dazu üben die extra- und intrazellulären Kalziumkonzentrationen sowie die Theophyllin-modulierte intrazelluläre cAMP-Konzentration einen erheblichen Einfluß aus. Die Annahme eines eng umschriebenen intrazellulären Ca^{++} -Konzentrationsbereiches für die optimale Sekretionsantwort in der zweiten Phase der Glucose-induzierten Insulinfreisetzung wird untermauert.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. AKPAN, J.O., HURLEY, M.C., LANDS, W.E.:
Insulin und Glucagon Secretion in Essential Fatty Acid Deficient Rats.
Acta Diabetol. Lat. 18 (2): 147-156 (1981).
2. AKPAN, J.O., HURLEY, M.C., PEK, S., LANDS, E.M.:
The Effects of Prostaglandins on Secretion of Glucagon and Insulin by the Perfused Rat Pancreas.
Can. J. Biochem. 57: 540-547 (1979).
3. AKTHAR, M.S., VERSPOHL, E., HEGNER, D., AMMON, P.T.:
6-Phosphogluconate/Glucose-6-Phosphate Ratio in Rat Pancreatic Islets During Inhibition of Insulin Release by Exogenous Insulin.
Diabetes 26 (9): 857-863 (1977).
4. ANDERSSON, T.:
Glucose-induced Retention of Intracellular ^{45}Ca in Pancreatic Islets.
Am. J. Physiol. 245 (Cell Physiol. 14): C343-C347 (1983).
5. ANDERSSON, T., BETSHOLTZ, C., HELLMANN, B.:
Calcium and Pancreatic Beta-Cell Function.
12. Modification of ^{45}Ca Fluxes by Excess of K^+ .
Acta Endocrinologica 96: 87-92 (1981).
6. ASHCROFT, S.J.H.:
Glucoreceptor Mechanisms and the Control of Insulin Release and Biosynthesis.
Diabetologia 18: 5-15 (1980).
7. ASHCROFT, S.J.H., SUDGEN, M.C., WILLIAMS, I.H.:
Carbohydrate Metabolism and the Glucoreceptor Mechanism.
Horm. Metab. Res., Supplement Series No. 10: 1-7 (1980).

8. ASHCROFT, S.J.H., WEERASINGHE, L.C.C., BASSETT, J.M.,
RANDLE, P.J.:
The Pentose Cycle and Insulin Release in Mouse Pancreatic Islets.
Biochem. J. 126: 525-532 (1972).
9. AXEN, K.V., SCHUBART, U.K., BLAKE, A.D., FLEISCHER, N.:
Role of Ca^{2+} in Secretagogue-Stimulated Breakdown of
Phosphatidylinositol in Rat Pancreatic Islets.
J. Clin. Invest. No. 72: 13-21 (1983).
10. BELLINGER, L.L., MENDEL, V.E., MOBERG, G.P.:
Circadian Insulin, GH, Prolactin, Corticosterone and
Glucose Rhythmus in Fed and Fasted Rats.
Horm. Metab. Res. 7: 132-135 (1975).
11. BERGSTEN, P., HELLMAN, B.:
Differentiation between the Short and Long Term Effects
of Glucose on the Intracellular Calcium Content of the
Pancreatic Beta-Cell.
Endocrinology 114 (5): 1854-1859 (1984).
12. BERGSTRÖM, S., DANIELSSON, H., KLENBERG, D.,
SAMUELSSON, B.:
The Enzymatic Conversion of Essential Fatty Acids into
Prostaglandins. Prostaglandins and Related Factors 34.
J. Biol. Chem. 239 (11): PC4006 (1964).
13. BERGSTRÖM, S., DANIELSSON, H., SAMUELSSON, B.:
The Enzymatic Formation of Prostaglandin E_2 from Arachi-
donic Acid. Prostaglandins and Related Factors 32.
Biochim. Biophys. Acta 90: 207-210 (1964).
14. BLACKARD, W.G., KIKUCHI, M., RABINOVITCH, A., RENOLD, A.E.:
An Effect of Hypoosmolarity on Insulin Release in Vitro.
Am. J. Physiol. 228 (3): 706-713 (1975).

15. BLOOM, G.D., HELLMAN, B., SEHLIN, J., TÄLJEDAL, I.B.:
Glucose-Stimulated and La^{3+} -nondisplaceable Ca^{2+} Pool
in Pancreatic Islets.
Am. J. Physiol. 232 (2): E 114-118 (1977).
16. BOTTERMAN, P., ERMILER, R., HENNER, J.:
A Semiautomatic Method for Immunoassay of Insulin and
Human Growth Hormone.
Horm. Metab. Res. 3: 55-56 (1971).
17. BOROWITZ, J.L., MATTHEWS, E.K.:
Calcium Exchangeability in Subcellular Fractions of
Pancreatic Islet Cells.
J. Cell Sci. 41: 233-243 (1980).
18. BRISSON, G.R., MALAISSE, W.J.:
The Stimulus-Secretion Coupling of Glucose-induced Insu-
lin Release. XI. Effects of Theophyllin and Epinephrine
on $^{45}\text{Ca}^{++}$ Efflux from Perifused Islets.
Metabolism 22 (3): 455-465 (1973).
19. BRISSON, G.R., MALAISSE-LAGAE, F., MALAISSE, W.J.:
The Stimulus-Secretion Coupling of Glucose-Induced In-
sulin Release. VII. A Proposed Site of Action for
Adenosine-3',5'-Cyclic Monophosphatase.
J. Clin. Invest. 51 (2): 232-241 (1972).
20. BURR, I.M., SHARP, R.:
Effects of Prostaglandin E_1 and of Epinephrine on the
Dynamics of Insulin Release in Vitro.
Endocrinology 94 (3): 835-839 (1974).
21. BUTCHER, R.W., SUTHERLAND, E.W.:
Adenosine 3',5'-Phosphate in Biological Materials.
J. Biol. Chem. 237 (4): 1244-1250 (1962).

22. CAMPILLO, J.E., LUYCKX, A.S., TORRES, M.D., LEFEBVRE, P.J.:
Effect of Oleic Acid on Insulin Secretion by the Isolated
Perfused Rat Pancreas.
Diabetologia 16: 267-273 (1979).
23. CAPITO, K., FORMBY, B., HEDESKOV, C.J.:
Ca-ATPases in Pancreatic Islets.
Horm. Metab. Res., Supplement Series No. 10: 50-54
(1980).
24. CAPITO, K., HEDESKOV, C.J.:
Effects of Glucose, Glucose Metabolites and Calcium Ions
on Adenylate Cyclase Activity in Homogenates of Mouse
Pancreatic Islets.
Biochem. J. 162: 569-573 (1977).
25. CARPINELLI, A.R., SENER, A., HERCHUELZ, A., MALAISSE, W.J.:
Stimulus-Secretion Coupling of Glucose-Induced Insulin
Release. Effect of Intracellular Acidification upon Cal-
cium Efflux from Islet Cells.
Metabolism 29 (6): 540-545 (1980).
26. CECIL, R., ROBINSON, G.B.:
The "Specific" Binding of Insulin to Polythene and other
Materials.
Biochim. Biophys. Acta 404: 164-168 (1975).
27. CERASI, E.:
Feed-Back Inhibition of Insulin Secretion in Subjects
with High and Low Insulin Response to Glucose.
Diabete & Metabolisme 1 (2): 73-76 (1975).
28. CERASI, E.:
Insulin Secretion: Mechanism of the Stimulation by Glu-
cose.
Quart. Rev. Biophysics 8 (1): 1-41 (1975).

29. CHARLES, M.A., LAWECKI, J., PICTET, R., GRODSKY, G.R.:
Insulin Secretion. Interrelationships of Glucose, Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate and Calcium.
J. Bio. Chem. 250 (15): 6134-6140 (1975).
30. CIABATTONI, G., PUGLIESE, F., SPALDI, M., CINOTTI, G.A., PATRONO, C.:
Radioimmunoassay Measurement of Prostaglandins E_2 and $F_{2\alpha}$ in Human Urine.
J. Endocrinol. Invest. 2: 173-182 (1979).
31. CLEMENTS, R.S., EVANS, M.H.:
Endogenous Prostaglandin Synthesis Causes the Biphasic Pattern of Insulin Secretion from Carbohydrate-Stimulated Islets.
Diabetes, Supplement 30: 1A (1981).
32. CLEMENTS, R.S., RHOTEN, W.B.:
Phosphoinositide Metabolism and Insulin Secretion from Isolated Rat Pancreatic Islets.
J. Clin. Invest. 57: 684-691 (1976).
33. Cook, D.L.:
Isolated Islets of Langerhans Have Slow Oscillations of Electrical Activity.
Metabolism 32 (7): 681-685 (1983).
34. COTTEE, F., FLOWER, R.J., MONCADA, S., SALOMON, J.A., VANE, J.R.:
Synthesis of 6-Keto-PGF $_{1\alpha}$ By Rat Seminal Vesicle Microsomes.
Prostaglandins 14 (3): 413-423 (1977).
35. CRAVEN, P.A., STUDER, R.K., DERUBERTIS, F.R.:
Renal Inner Medullary Prostaglandin Synthesis. A Calcium Calmodulin-Dependent Process Suppressed by Urea.
J. Clin. Invest. 68: 722-732 (1981).

36. CURRY, D.L., BENNETT, L.L., GRODSKY, G.M.:
Dynamics of Insulin Secretion by the Perfused Rat Pan-
creas.
Endocrinology 83: 572-584 (1968).
37. CURRY, D.L., BENNETT, L.L., GRODSKY, G.M.:
Requirement for Calcium Ion in Insulin Secretion by the
Perfused Rat Pancreas.
Am. J. Physiol. 214 (1): 174-178 (1968).
38. CURRY, D.L., CURRY, K.P.:
Hypothermia and Insulin Secretion.
Endocrinology 87: 750-755 (1970).
39. DEMBINŚKA-KIEĆ, A., KOSTKA-TRABKA, E., GRODZINSKA, L.,
ZMUDA, A., BIEROŃ, K., KEDZIOR, A., OCHMAŃSKI, W.,
ZELAZNY, T.:
Prostacyclin and Blood Glucose Levels in Humans and
Rabbits.
Prostaglandins 21 (1): 113-121 (1981).
40. DORP, D.A. van, BEERTHUIS, R.K., NUGTEREN, D.H.,
VONKEMAN, H.:
Biosynthesis of Prostaglandins.
Biochim. Biophys. Acta 90: 204-207 (1964).
41. EVANS, M.H., PACE, C.S., CLEMENTS, R.S., Jr.:
Endogenous Prostaglandin Synthesis and Glucose-Induced
Insulin Secretion from the Adult Rat Pancreatic Islet.
Diabetes 32: (6): 509-515 (1983).
42. FELDMAN, J.M.:
Species Variation in the Islets of Langerhans.
Diabetologia 16: 1-4 (1979).

43. FLECKENSTEIN, A.:
Specific Inhibitors and Promoters of Calcium Action in
the Excitation-Contraction Coupling of Heart Muscle and
their Role in Prevention or Production of Myocardial Lesion.
In: Calcium and the Heart, (Harris, P. and Opie, L.,
Eds., London, Academic Press): 135-138 (1971).

44. FORMBY, B., CAPITO, K.; EGEBERG, J., HEDESKOV, C.J.:
Ca-activated ATPase Activity in Subcellular Fractions
of Mouse Pancreatic Islets.
Am. J. Physiol. 230 (2): 441-448 (1976).

45. FRANKEL, B.J., KROMHOUT, J.A., IMAGAWA, W.,
LANDAHL, H.D., GRODSKY, G.M.:
Glucose-stimulated ^{45}Ca Uptake in Isolated Rat Islets.
Diabetes 27 (4): 365-369 (1978).

46. GOODMAN, D.B.P., RASMUSSEN, H., DiBELLA, F., GUTHROW, C.E.
Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate-Stimulated Phos-
phorylation of Isolated Neurotubule Subunits.
Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 67 (2): 652-659 (1970).

47. GRATZL, M., EKERDT, R., DAHL, G.:
The Role of Ca^{2+} as Trigger for Membrane Fusion.
Horm. Metab. Res., Supplement Series No. 10:
144-148 (1980).

48. GREEN, K., SAMUELSSON, B.:
Prostaglandins and Related Factors: XIX.
Thin Layer Chromatography of Prostaglandins.
J. Lipid Res. 5: 117-120 (1964).

49. GRILL, V.:
Role of Cyclic AMP in Insulin Release Evoked by Glucose
and other Secretagogues.
Horm. Metab. Res., Supplement Series No. 10: 43-49 (1980)

50. GRODSKY, G.M.:
Secretion of Insulin. The Kinetics of Insulin Release.
Handbuch Exp. Pharm. XXXII/2, Insulin II: 1-12 (1975)
(Ed. by Hasselblatt, A. and Bruchhausen, F., Springer
Verl. Berlin-Heidelberg-N.Y.)

51. GRODSKY, G.M., BATTS, A.A., BENNETT, L.L., VCELLA, C.,
McWILLIAMS, N.B., SMITH, D.F.:
Effects of Carbohydrates on Secretion of Insulin from
Isolated Rat Pankreas.
Am. J. Physiol. 205 (4): 638-644 (1963).

52. HAHN, H.J., GYLFE, E., HELLMAN, B.:
Glucose-Dependent Effect of Methylxanthines on the ⁴⁵Ca
Distribution in Pancreatic Beta-Cells.
FEBS Letters 103 (2): 348-351 (1979).

53. HAHN, H.J., GYLFE, E., HELLMAN, B.:
Calcium and Pancreatic Beta-Cell Function. 7. Evidence
for Cyclic AMP-Induced Translocation of Intracellular
Calcium.
Biochimica et Biophysica Acta 630 : 425-432 (1980).

54. HALES, C.N., RANDLE, P.J.:
Immunoassay of Insulin with Insulin-Antibody Precipitate
Biochem. J. 88: 137-146 (1963).

55. HAMANDŽIĆ, M., MALIK, K.U.:
Prostaglandins in Adrenergic Transmission of Isolated
Perfused Rat Pancreas.
Am. J. Physiol.: Endocrinol. Metab. Gastrointest.
Physiol. 1 (2): E201-E209 (1977).

56. HAMBERG, M., SAMUELSSON, B.:
Detection and Isolation of an Endoperoxide Intermediate
in Prostaglandin Biosynthesis.
Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 70 (3): 899-903 (1973).

57. HEDESKOV, C.J.:
Mechanisms of Glucose-Induced Insulin Secretion.
Physiol. Rev. 60 (2): 442-509 (1980).
58. HELLMAN, B.:
The Significance of Calcium for Glucose Stimulation of
Insulin Release.
Endocrinology 97 (2): 392-398 (1975).
59. HELLMAN, B.:
Stimulation of Insulin Release after Raising Extracellu-
lar Calcium.
FEBS Letters 63 (1): 125-128 (1976).
60. HELLMAN, B.:
Calcium and Pancreatic Beta-Cell Function. 3. Validity
of the La^{3+} -Wash Technique for Discriminating between
Superficial and Intracellular $^{45}\text{Ca}^{++}$.
Biochim. Biophys. Acta 540: 534-542 (1978).
61. HELLMAN, B., ANDERSSON, T.:
Calcium and Pancreatic Beta-Cell Function. 4. Evidence
that Glucose and Phosphate Stimulate Calcium-45 Incorpo-
ration into Different Intracellular Pools.
Biochim. Biophys. Acta 541 (4): 483-491 (1978).
62. HELLMAN, B., GYLFE, E.:
Calcium and Pancreatic Beta-Cell Function: Glucose Sti-
mulation of Uptake of Lanthanum-Displaceable $^{45}\text{Ca}^{++}$ from
Low or Normal Calcium-Containing Media.
Horm. Metab. Res. 10: 29-31 (1978).
63. HELLMAN, B., IDAHL, L.A., LERNMARK, A., SEHLIN, J.,
TÄLJEDAL, I.B.:
The Pancreatic Beta-Cell Recognition of Insulin Secreta-
gogues. Comparisons of Glucose with Glyceraldehyde Iso-
mers and Dihydroxyacetone.
Arch. Biochem. Biophys. 162: 448-457 (1974).

64. HELLMAN, B., IDAHL, L-A., LERNMARK, A., SEHLIN, J.,
TÄLJEDAL, I-B.:
The Pancreatic Beta-Cell Recognition of Insulin Secre-
tagogues. Effects of Calcium and Sodium on Glucose Meta-
bolism and Insulin Release.
Biochem. J. 138: 33-45 (1974).
65. HELLMAN, B., SEHLIN, J., TÄLJEDAL, I-B.:
Calcium Uptake by Pancreatic Beta-Cells as Measured with
the Aid of ^{45}Ca and Mannitol- ^3H .
Am. J. Physiol. 221 (6): 1795-1801 (1971).
66. HELLMAN, B., SEHLIN, J., TÄLJEDAL, I-B.:
Evidence for Mediated Transport of Glucose in Mammalian
Pancreatic Beta-Cells.
Biochim. Biophys. Acta 241: 147-154 (1971).
67. HELLMAN, B., SEHLIN, J., TÄLJEDAL, I-B.:
Effects of Glucose on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ Uptake by Pancreatic Islets
as Studied with the Lanthanum Method.
J. Physiol., (London) 254: 639-656 (1976).
68. HELLMAN, B., SEHLIN, J., TÄLJEDAL, I-B.:
Effects of Na^+ , K^+ and Mg^{2+} on the $^{45}\text{Ca}^{2+}$ Uptake by
Pancreatic Islets.
Pflügers Archiv 378: 93-97 (1978).
69. HENQUIN, J.C.:
D-Glucose Inhibits Potassium Efflux from Pancreatic
Islets.
Nature 271: 271-273 (1978).
70. HENQUIN, J.C.:
Relative Importance of Extracellular and Intracellular
Calcium for the Two Phases of Glucose-Stimulated Insulin
Release: Studies with Theophylline.
Endocrinology 102 (3): 723-730 (1978).

71. HENQUIN, J.C.:
Metabolic Control of the Potassium Permeability in
Pancreatic Islet Cells.
Biochem. J. 186: 541-550 (1980).
72. HENQUIN, J.C.:
The Potassium Permeability of Pancreatic Islet Cells:
Mechanism of Control and Influence on Insulin Release.
Horm. Metab. Res., Supplement Series No. 10: 66-72 (1980).
73. HENQUIN, J.C.:
Specifity of Divalent Cation Requirement for Insulin
Release. Effect of Strontium.
Pflügers Archiv 383: 123-129 (1980).
74. HENQUIN, J.C.:
Tolbutamide Stimulation and Inhibition of Insulin Re-
lease: Studies of the Underlying Ionic Mechanism in Iso-
lated Rat Islets.
Diabetologia 18: 151-160 (1980).
75. HENQUIN, J.C., CHARLES, S., HENQUIN, M., MATHOT, F.,
TAMAGAWA, T.:
Diazoxide and D 600. Inhibition of Insulin Release.
Distinct Mechanisms Explain the Specifity for Different
Stimuli.
Diabetes 31: 776-783 (1982).
76. HENQUIN, J.C., MEISSNER, H.P., PREISLER, M.:
9-Aminoacridine- and Tetraethylammonium-Induced Reduc-
tion of the Potassium Permeability in Pancreatic B-Cells
Effects on Insulin Release and Electical Properties.
Biochim. Biophys. Acta 587 (4):
77. HERCHUELZ, A., COUTURIER, E., MALAISSE, W.J.:
Regulation of Calcium Fluxes in Pancreatic Islets:
Glucose-Induced Calcium-Calcium Exchange.
Am. J. Physiol. 238 (2): E96-E103 (1980).

78. HERCHUELZ, A., LEBRUN, P., CARPINELLI, A., THONNART, N.,
SENER, A., MALAISSE, W.J.:
Regulation of Calcium Fluxes in Rat Pancreatic Islets.
Quinine Mimics the Dual Effect of Glucose on Calcium
Movements.
Biochim. Biophys. Acta 640 (1): 16-30 (1981).
79. HERCHUELZ, A., MALAISSE, W.J.:
Regulation of Calcium Fluxes in Pancreatic Islets:
Dissociation between Calcium and Insulin Release.
J. Physiol. (London) 283: 409-424 (1979).
80. HERCHUELZ, A., MALAISSE, W.J.:
The dual regulation of Calcium efflux from pancreatic
islets.
Horm. Met. Res., Suppl. Ser. No. 10: 116-121 (1980).
81. HOLLEY, D.C., BAGBY, G.J., CURRY, D.L.:
Ethanol-Insulin Interrelationships in the Rat Studied
In Vitro and In Vivo: Evidence for direct Ethanol Inhi-
bition of Biphasic Glucose-Induced Insulin Secretion.
Metabolism 30 (9): 894-899 (1981).
82. HOWELL, S.L., MONTAGUE, W.:
Regulation by Nucleotides of ⁴⁵Calcium Uptake in Homoge-
nates of Rat Islets of Langerhans.
FEBS Letters 52 (1): 48-52 (1975).
83. HOWELL, S.L., WHITFIELD, M.:
Cytochemical Localization of Adenyl Cyclase Activity
in Rat Islets of Langerhans.
J. Histochem. Cytochem. 20 (11): 873-879 (1972).
84. HULAN, H.W., KRAMER, J.K.G.:
The Effect of Long-Chain Monoenes on Prostaglandin E₂
Synthesis by Rat Skin.
Lipids 12 (7): 604-609 (1977).

85. HUTTON, J.C., SENER, A., HERCHUELZ, A., ATWATER, I., KAWAZU, S., BOSCHERO, A.C., SOMERS, G., DEVIS, G., MALAISSE, W.J.:
Similarities in the Stimulus-Secretion Coupling Mechanisms of Glucose- and 2-Keto Acid-Induced Insulin Release.
Endocrinology 106 (1): 203-219 (1980).
86. HUTTON, J.C., SENER, A., HERCHUELZ, A., VALVERDE, I., BOSCHERO, A.C., MALAISSE, W.J.:
The Stimulus-Secretion Coupling of Glucose-Induced Insulin Release. XVII. Effects of Extracellular pH on Insulin Release: Their Dependency on Nutrient Concentration.
Horm. Metab. Res. 12 (7): 294-299 (1980).
87. ISHIBASHI, F., SATO, T., ONARI, K., TSUBOTA, M., KAWATE, R.:
Metabolism, ⁴⁵Ca Uptake and Insulin Releasing Capacities of Glucose and Mannose.
Metabolism 29 (7): 682-685 (1980).
88. IVERSEN, J., HERMANSEN, K.:
Characterization of the Inhibitory Effect of Somatostatin Upon Insulin and Glucagon Release in the Isolated Perfused Canine Pancreas:
Evidence for Interaction with Calcium.
Metabolism 29 (2): 151-160 (1980).
89. JOHNSON, D.G., FUJIMOTO, W.Y., WILLIAMS, R.H.:
Enhanced Release of Insulin by Prostaglandins in Isolated Pancreatic Islets.
Diabetes 22 (9): 658-663 (1973).
90. JOHNSON, D.G., THOMPSON, W.J., WILLIAMS, R.H.:
Regulation of Adenyl Cyclase from Isolated Pancreatic Islets by Prostaglandins and Guanosine 5'-Triphosphate.
Biochem. 13 (9): 1920-1924 (1974).

91. KALKOFF, R.K., SIEGESMUND, K.A., DRAGEN, R.F.:
Tolbutamide Perfusion of Rat Islets. Sequential Changes
in Calcium, Phosphorus, Sodium, Potassium and Chlorine
in Single Beta-Cells.
J. Clin. Invest. 72: 478-482 (1983).
92. KANATSUKA, A., MAKINO, H., MATSUSHIMA, Y., KASANUKI, J.,
OSEGAWA, M., KUMAGI, A.:
Effect of Calcium on the Secretion of Somatostatin and
Insulin from Pancreatic Islets.
Endocrinology 108 (6): 2254-2257 (1981).
93. KARIM, S.M.M., HILLIER, K., DEVLIN, J.:
Distribution of Prostaglandins E_1 , E_2 , $F_{1\alpha}$ and $F_{2\alpha}$, in
some Animal Tissues.
J. Pharm. Pharmac. 20: 749-753 (1968).
94. KATO, R., YAMAMOTO, S., NAKADATE, T., NAKAKI, T.:
Possible Involvement of Phospholipase A_2 Activation and
Lipoxygenase Product(s) in the Mechanism of Insulin
Secretion.
Adv. Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Res. 12:
265-270 (1983).
95. KIKUCHI, M., CUENDET, G.S., RENOLD, A.E., SHARP, G.W.G.:
Kinetic Study of Glucose Effect on $^{45}\text{Ca}^{++}$ efflux and In-
sulin Release from 46 Hour-Preload Rat Islets at
Different Temperatures and Ca^{++} Concentrations.
Diabetologia 12 (4): 402 (1976).
96. KIKUCHI, M., WOLLHEIM, C.B., CUENDET, G.S., RENOLD, A.E.
SHARP, G.W.G.:
Studies on the Dual Effects of Glucose on $^{45}\text{Ca}^{++}$ Efflux
from Isolated Rat Islets.
Endocrinology 102 (5): 1339-1349 (1978).

97. KIKUCHI, M., WOLLHEIM, C.B., SIEGEL, E.G.,
RENOLD; A.E., SHARP, G.W.G.:
Biphasic Insulin Release in Rat Islets of Langerhans and
the Role of Intracellular Ca^{++} -Stores.
Endocrinology 105 (4): 1013-1019 (1979).
98. KIM, Y.C., BRODOWS, R.G.:
Starvation Stimulates Pancreatic PGE Content.
Prostaglandins 25 (3): 365-371 (1983).
99. KLINGENBURG, M.:
Veränderungen der Insulinsekretionskinetik nach extremen
Ernährungsbedingungen. Radioimmunologische Insulinbe-
stimmungen am isolierten, perfundierten Pankreas der
Ratte.
Dissertation, München, Ludwig Maximilians-Universität,
(1980).
100. KLÖPPEL, G., BOMMER, G.:
Ultracytochemical Calcium Distribution in B-Cells in
Relation to Biphasic Glucose-stimulated Insulin Release
by the Perfused Rat Pancreas.
Diabetes 28 (6): 585-592 (1979).
101. LANDGRAF, R., KOTLER-BRAJTBURG, J., MATSCHINSKY, F.M.:
Kinetics of Insulin Release from the Perfused Rat Pan-
creas Caused by Glucose, Glucosamine, and Galactose.
Proc. Nat. Acad. Sci. 68 (3): 536-540 (1971).
102. LANDGRAF, R., LANDGRAF-LEURS, M.M.C.:
The Prostaglandin System and Insulin Release.
Studies with the Isolated Perfused Rat Pancreas.
Prostaglandins 17 (4): 599-613 (1979).
103. LANDGRAF, R., LANDGRAF-LEURS, M.M.C., HÖRL, R.:
L-Leucine and L-Phenylalanine Induced Insulin Release
and the Influence of D-Glucose.
Diabetologia 10: 415-420 (1974).

104. LANDGRAF-LEURS, M.M.C., LANDGRAF, R., DAFFNER, R., HÖRL,
The Stimulatory and Inhibitory Function of Theophylline
on Amino Acid-Induced Insulin Release: Studies with the
Perfused Rat Pancreas.
Endocrinology 97 (6): 1416-1423 (1975).
105. LAYCHOCK, S.G.:
Phospholipase A₂ Activity in Pancreatic Islets is Cal-
cium-Dependent and Stimulated by Glucose.
Cell Calcium 3: 43-54 (1982).
106. LAYCHOCK, S.G.:
Fatty Acid Incorporation into Phospholipids of Isolated
Pancreatic Islets of the Rat. Relationship to Insulin
Release.
Diabetes 32: 6-13 (1983).
107. LEBRUN, P., MALAISSE, W.J., HERCHUELZ, A.:
Modalities of Gliclazide-induced Ca²⁺Influx into the
Pancreatic B-Cell.
Diabetes 31: 1010-1015 (1982).
108. LEBRUN, P., MALAISSE, W.J., HERCHUELZ, A.:
Nutrient-Induced Intracellular Calcium Movement in Rat
Pancreatic B-Cell.
Am. J. Physiol. 243 (Endocrinol. Metab. 6): E196-E205 (1982).
109. LECLERQ-MEYER, V., MARCHAND, J., MALAISSE, W.J.:
The Role of Calcium in Glucagon Release. Studies with
Verapamil.
Diabetes 27 (10): 996-1004 (1978).
110. LENZEN, S., KLÖPPEL, G.:
Intracellular Localization of Calcium in Pancreatic B-
Cells in Relation to Insulin Secretion by the Perfused
ob/ob Mouse Pancreas.
Endocrinology 114 (3): 1012-1020 (1984).

111. LERNMARK, A.:
Isolated Mouse Islets as a Model for Studying Insulin Release.
Acta Diabetologica Lat. 8: 649-679 (1971)
112. MACADAMS, M.R., PEK, S.B., LANDS, W.E.M.:
The Effect of Flurbiprofen, a Potent Inhibitor of Prostaglandin Synthesis, on Insulin and Glucagon Release from Isolated Rat Pancreas.
Endocrinology 114 (4): 1364-1370 (1984).
113. MALAISSE, W.J., CARPINELLI, A.R., SENER, A.:
The Stimulus-Secretion Coupling of Glucose-Induced Release: Timing of Early Metabolic, Ionic, and Secretory Events.
Metabolism 30 (5): 527-532 (1981).
114. MALAISSE, W.J., BRISSON, G.R., BAIRD, L.E.:
The Stimulus-Secretion Coupling of Glucose-Induced Insulin Release. X. Effect of Glucose on ⁴⁵Ca Efflux from perfused Islets.
Am. J. Physiol. 224 (2): 389-394 (1973).
115. MALAISSE, W.J., BRISSON, G.R., MALAISSE-LAGAE, F.:
Cyclic AMP-Induced Translocation of Calcium in Isolated Islets.
Diabetes 20, Supplement 1: 328-329 (1971).
116. MALAISSE, W.J., DEVIS, G., PIPELEERS, D.G., SOMERS, G.:
Calcium-Antagonists and Islet Function, IV, Effect of D 600.
Diabetologia 12: 77-81 (1976).
117. MALAISSE, W.J., HUTTON, J.C., KAWAZU, S., HERCHUELZ, A., VALVERDE, I., SENER, A.:
The Stimulus-Secretion Coupling of Glucose-Induced Insu-

lin Release. XXXV. The Links between Metabolic and Cationic Events.

Diabetologia 16: 331-341 (1979).

118. MALAISSE, W.J., MALAISSE-LAGAE, F.:
A Possible Role for Calcium in the Stimulus-Secretion Coupling fo Glucose-Induced Insulin Secretion.
Acta Diabetologica Lat. 7, (Suppl. 1): 264-275 (1970).
119. MALAISSE, W.J., SENER, A., HERCHUELZ, A., HUTTON, J.C.:
A Possible Role for the Adenylcyclase System in Insulin Secretion.
J.Clin. Invest. 46 (11): 1724-1734 (1967).
120. MALAISSE, W.J., SENER, A., HERCHUELZ, A., HUTTON, J.C.:
Insulin Release: The Fuel Hypothesis.
Metabolism 28 (4): 373-386 (1979).
121. MALAISSE; W.J., SENER, A., LEVY, J., HERCHUELZ, A.:
The Stimulus-Secretion Coupling of Glucose-Induced Insulin Release. XXII. Quantitative and Qualitative Aspects of Glycolysis in Isolated Islets.
Acta Diabet. Lat. 13: 202-215 (1976).
122. MALAISSE, W.J., VALVERDE, I., OWEN, A., VERHULST, D., CANTRAINE, F.:
Mathematical Modelling of Cyclic AMP-Ca²⁺ Interactions In Pancreatic Islets.
Diabetes 31: 170-177 (1982).
123. MALAISSE-LAGAE, F., AMHERDT, M., RAVAZZOLA, M., SENER, HUTTON, J.C., ORCI, L., MALAISSE, W.J.:
Role of Microtubules in the Synthesis, Conversion, and Release of (Pro)Insulin.
A Biochemical and Radioautographic Study in Rat Islets.
J. Clin. Invest. 63: 1284-1296 (1979).

124. MALAISSE-LAGAE, F., MALAISSE, W.J.:
The Stimulus-Secretion Coupling of Glucose-Induced Insulin Release. III. Uptake of 45 Calcium by Isolated Islets of Langerhans.
Endocrinology 88: 72-80 (1971).
125. MARSCHNER, I., ERHARDT, F., SCRIBA, P.C.:
The Calculation of the Radioimmunoassay Standard Curve by "Spline Function".
International Atomic Energy Agency 1: 111-122 (1974).
126. MATSCHINSKY, F.M., ELLERMAN, J.E.:
Metabolism of Glucose in the Islets of Langerhans.
J. Biol. Chem. 243 (10): 2730-2736 (1968).
127. MATSCHINSKY, F.M., LANDGRAF, R., ELLERMAN, J., KOTLER-BRAJTBURG, J.:
Glucoreceptor Mechanisms in Islets of Langerhans.
Diabetes 21, Suppl. 2: 555-569 (1972).
128. MAYER, L.M.:
Untersuchungen über den Einfluß von Membran-aktiven Substanzen auf die Insulinsekretion.
Dissertation, Ludwig Maximilians-Universität München (1976).
129. McDANIEL, M.L., WEAVER, D.C., ROTH, C.E., FINK, C.J., SWANSON, C.J., LACY, P.E.:
Characterization of the Uptake of the Methylxanthines Theophylline and Caffeine on Isolated Pancreatic Islets and their Effect on D-Glucose Transport.
Endocrinology 101: 1701-1708 (1977).
130. MEGLASSON, M., MATSCHINSKY, F.M.:
New Perspectives on Pancreatic Islet Glucokinase.
Am J. Physiol. 246 (Endocrinol. Metab. 9): E1-E13 (1984).

131. MEHNERT, H.:
Diabetes mellitus: Entwicklung einer Krankheit.
In: Mitteilungen der Deutschen Forschungsgemeinschaft
3/82: I - VIII (1982).
132. METZ, S.A.:
Glucose Promotes Lipxygenase-Mediated Metabolism of
Arachidonic Acid (AA) in Rat Islets.
Clin. Res. 32 (1): 51A (1984).
133. METZ, S.A.:
Is Phospholipase A_2 a "Glucose Sensor" Responsible for
the Phasic Pattern of Insulin Release?
Prostaglandins 27 (1): 147-158 (1984).
134. METZ, S.A., FUJIMOTO, W., ROBERTSON, R.P.:
Modulation of Insulin Secretion by Cyclic AMP and
Prostaglandin E: The Effects of Theophylline, Sodium
Salicylate and Tolbutamide.
Metabolism 31 (10): 1014-1022 (1982).
135. METZ, S.A., MURPHY, R.C., FUJIMOTO, W.:
Effects on Glucose-Induced Insulin Secretion of Lipoxy-
genase-Derived Metabolites of Arachidonic Acid.
Diabetes 33: 119-124 (1984).
136. METZ, S.A., VANROLLINS, M., STRIFE, R., FUJIMOTO, W.,
ROBERTSON, R.P.:
Lipxygenase Pathway in Islet Endocrine Cells.
Oxidative Metabolism of Arachidonic Acid Promotes Insu-
lin Release.
J. Clin. Invest. 71: 1191-1205 (1983).
137. MILNER, R.D.G., HALES, C.N.:
The Role of Calcium and Magnesium in Insulin Secretion
from Rabbit Pancreas Studied In Vitro.
Diabetologia 3 (1): 47-49 (1967).

138. MONTAGUE, W., PARKIN, E.N.:
Changes in Membrane Lipids of the B-Cell during Insulin Secretion.
Horm. Metab. Res., Supplement Series No. 10: 153-156 (1980).

139. NABER, S.P., McDONALD, J.M., JARETT, L., McDANIEL, M.L., LUDVIGSEN, C.W., LACY, P.E.:
Preliminary Characterization of Calcium Binding in Islet-Cell Plasma Membranes.
Diabetologia 19: 439-444 (1980).

140. PACE, C.S., TARVIN, J.T.:
Influence on Anion Transport on Glucose-Induced Electrical Activity in the B-Cell.
Diabetes 31: 653-655 (1982).

141. PACE, C.S., TARVIN, J.T., SMITH, J.S.:
Stimulus-Secretion Coupling in Beta-Cells: Modulation by pH.
Am J. Physiol. 244 (Endocrinol. Metab. 7): E3-E18 (1983).

142. PANTEN, U., CHRISTIANS, J., KRIEGSTEIN, E.V., POSER, W., HASSELBLATT, A.:
Effect of Carbohydrates upon Fluorescence of Reduced Pyridine Nucleotides from Perfused Isolated Pancreatic Islets.
Diabetologia 9: 477-482 (1973).

143. PATEL, D.G., SINGH, S.P.:
Effect of Ethanol and its Metabolites on Glucose Mediated Insulin Release from Isolated Islets of the Rats.
Metabolism, 28 (1): 85-89 (1979).

144. PEK, S., TAI, T.-Y., ELSTER, A.:
Stimulatory Effects of Prostaglandins E-1, E-2 and F-2

Alpha on Glucagon and Insulin Release In Vitro.
Diabetes 27 (8): 801-809 (1978).

145. PEK, S., TAI, T.-Y., ELSTER, A., FAJANS, S.S.:
Stimulation by Prostaglandin E₂ of Glucagon and Insulin
Release from Isolated Rat Pancreas.
Prostaglandins 10 (3): 493-502 (1975).
146. REBOLLEDO, O.R., HERNANDEZ, R.E., ZANETTA, A.C.,
GAGLIARDINO, J.J.:
Insulin Secretion during Acid-Base Alterations.
Am. J. Physiol. 234 (4): E426-E429 (1978).
147. REED, P.W., KNAPP, H.R.:
Prostaglandins and Calcium
Ann. N.Y. Acad. Sci. 307: 445-447 (1978).
148. REESE, A.C., LANDAU, B.R., CRAIG, J.W., GIN, G.,
RODMAN, H.M.:
Glucose Metabolism by Rat Pancreatic Islets In Vitro.
Metabolism 22 (3): 467-472 (1973).
149. RIBALET, B., BEIGELMAN, P.M.:
Calcium Action Potentials and Potassium Permeability
Activation in Pancreatic Beta-Cells.
Am. J. Physiol. 239 (3): C124-C133 (1981).
150. ROBERTSON, R.P.:
Prostaglandins as Modulators of Pancreatic Islet
Function.
Diabetes 28: 943-948 (1979).
151. ROBERTSON, R.P.:
Hypothesis: PGE, Carbohydrate Homeostasis, and Insulin
Secretion. A Suggested Resolution of the Controversy.
Diabetes 32: 231-234 (1983).

152. ROSEMAN, T.J., SIMS, B., STEHLE, R.G.:
Stability of Prostaglandins.
Amer. J. Hosp. Pharm. 30: 236-239 (1973).

153. RUBIN, R.P., KELLY, K.L., HALENDA, S.P., LACHOCK, S.G.:
Arachidonic Acid Metabolism in Rat Pancreatic Acinar
Cells: Calcium-Mediated Stimulation of the Lipoygenase
System.
Prostaglandins 24 (2): 179-193 (1982).

154. SACCÀ, L., PEREZ, G.:
Influence of Prostaglandins on Plasma Glucagon Levels
in the Rat.
Metabolism 25 (2): 127-130 (1976).

155. SAMS, D.J., MONTAGUE, W.:
The Role of Adenosine 3',5'-Cyclic Monophosphate in the
Regulation of Insulin Release. Properties of Islet-Cell
Adenosine 3',5'-Cyclic Monophosphate Phosphodiesterase.
Biochem. J. 129: 945-952 (1972).

156. SAMUELSSON, B., GOLDYNE, M., GRANSTRÖM, E., HAMBERG, M.,
HAMMARSTRÖM, S., MALMSTEN, C.:
Prostaglandins and Thromboxanes.
Ann. Rev. Biochem. 47: 997-1029 (1978).

157. SAUNDERS, R.N., MOSER, C.A.:
Changes in Vascular Resistance Induced by Prostaglandins
 E_2 and $F_{2\alpha}$ in Isolated Rat Pancreas.
Arch. Int. Pharmacodyn. 197: 86-92 (1972).

158. SCHÖNBORN, J., WESTPHAL, P., PANTEN, U.:
Insulin Release from the Isolated Perfused Rat Pancreas
Induced by L-Leucine, 2-Aminonorbornane-2-carboxylic
Acid and Alpha-Ketoisocaproic Acid.
Horm. Metab. Res. 7: 127-131 (1975).

159. SCHUBART, U.K., ERLICHMAN, J., FLEISCHER, N.:
Insulin Release and Protein Phosphorylation: Possible
Role of Calmodulin.
Fed. Proc. 41 (7): 2278-2282 (1982).
160. SEHLIN, J.:
Calcium Uptake by Subcellular Fractions of Pancreatic
Islets. Effects of Nucleotides and Theophylline.
Biochem. J. 156: 63-69 (1976).
161. SENER, A., HUTTON, J.C., KAWAZU, S., BOSCHERO, A.C.,
SOMERS, G., DEVIS, G., HERCHUELZ, A., MALAISSE, W.J.:
The Stimulus-Secretion Coupling of Glucose-Induced In-
sulin Release. Metabolic and Functional Effects of NH_4^+
in Rat Islets.
J. Clin. Invest. 62 (4): 868-878 (1979).
162. SENER, A., KAWAZU, S., HUTTON, J.C., BOSCHERO, A.C.,
DEVIS, G., SOMERS, G., HERCHUELZ, A., MALAISSE, W.J.:
The Stimulus-Secretion Coupling of Glucose-Induced In-
sulin Release. Effect of Exogenous Pyruvate on Islet
Function.
Biochem. J. 176: 217-232 (1978).
163. SENER A., KAWAZU, S., MALAISSE, W.J.:
The Stimulus-Secretion Coupling of Glucose-Induced Insu-
lin Release. Metabolism of Glucose in K^+ -Deprived Islets
Biochem. J. 186: 183-190 (1980).
164. SHAH, J.H., WONGSURAWAT, N., ARAN, P.P.:
Effect of Ethanol on Stimulus-Induced Insulin Secretin
and Glucose Tolerance. A Study of Mechanisms.
Diabetes 26 (4): 271-277 (1977).

165. SHARP, G.W.G.:
The Adenylate Cyclase-Cyclic AMP System in Islets of Langerhans and its Role in the Control of Insulin Release. *Diabetologia* 16: 287-296 (1979).
166. SHARP, G.W.G., WIEDENKELLER, D.E., KAELEN, D., SIEGEL, E.G., WOLLHEIM, C.B.:
Stimulation of Adenylate Cyclase by Ca^{2+} and Calmodulin in Rat Islets of Langerhans. Explanation for the Glucose Induced Increase in Cyclic AMP Levels. *Diabetes* 29 (1): 74-77 (1980).
167. SIEGEL, E.G., WOLLHEIM, C.B., KIKUCHI, M., RENOLD, A.E., SHARP, G.W.:
Dependency of Cyclic AMP-Induced Insulin Release on Intra- and Extracellular Calcium in Rat Islets of Langerhans. *J. Clin. Invest.* 65 (2): 233-241 (1980).
168. SINGH, S.P., PATEL, D.G., SNYDER, A.K.:
Ethanol Inhibition of Insulin Secretion by Perfused Rat Islets. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* 93 (1): 61-66 (1980).
169. SOMERS, G., DEVIS, G., OBBERGHEN, E. van, MALAISSE, W.J.
Calcium Antagonists and Islet Function. II. Interaction of Theophylline and Verapamil. *Endocrinology* 99 (1): 114-124 (1976).
170. SUGDEN, M.C., ASHCROFT, S.J.H.:
Phosphoenolpyruvate in Rat Pancreatic Islets: A Possible Intracellular Trigger of Insulin Release? *Diabetologia* 13: 481-486 (1977).
171. SUDGEN, M.C., ASHCROFT; S.J.H.:
Effects of Phosphoenolpyruvate, other Glycolytic Intermediates and Methylxanthines on Calcium Uptake by a Mitochondrial Fraction from Rat Pancreatic Islets. *Diabetologia* 15: 173-180 (1978).

172. SUDGEN, M.C., CHRISTIE, M.R., ASHCROFT, S.J.H.:
Presence and Possible Role of Calcium-Dependent Regulator (Calmodulin) in Rat Islets of Langerhans.
FEBS Letters 105 (1): 95-100 (1979).
173. SUN, F.F., CHAPMAN, J.P., McGUIRE, J.C.:
Metabolism of Prostaglandin Endoperoxide in Animal Tissues.
Prostaglandins 14 (6): 1055-1074 (1977).
174. SUSSMAN, K.E., LEITNER, J.W.:
Cyclic AMP Stimulated Protein Activity within the Secretory Vesicle Fraction of Rat Islets.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 79 (2): 429-437 (1977).
175. SUSSMAN, K.E., VAUGHAN, G.D.:
Insulin Release After ACTH, Glucagon and Adenosine-3',5'-Phosphate (Cyclic AMP) in the Perfused Isolated Rat Pancreas.
Diabetes 16 (1): 449-454 (1967).
176. SUSSMAN, K.E., VAUGHAN, G.D., TIMMER, R.F.:
An In Vitro Method for Studying Insulin Secretion in the Perfused Isolated Rat Pancreas.
Metabolism 15 (5): 466-476 (1966).
177. TÄLJEDAL, I-B.:
On Insulin Secretion.
Diabetologia 21: 1-17 (1981).
178. TAMAGAWA, T., HENQUIN, J.C.:
Chloride Modulation of Insulin Release, $^{86}\text{Rb}^+$ Efflux and $^{45}\text{Ca}^{++}$ Fluxes in Rat Islets stimulated by various secretagogues.
Diabetes 32: 416-423 (1983).
179. TOMLINSON, S., WALKER, S.W., BROWN, B.L.:
Calmodulin and Insulin Secretion.
Diabetologia 22: 1-5 (1982).

180. TIENGO, A., VALERIO, A., MOLINARI, M., MENEGHEL, A.,
LAPOLLA, A.:
Effect of Ethanol, Acetaldehyde, and Acetate on Insulin
and Glucaon Secretion in the Perfused Rat Pancreas.
Diabetes 30: 705-709 (1981).
181. TURTLE, J.R., KIPNIS, D.M.:
An Adrenergic Receptor Mechanism for the Control of
Cyclic 3',5'-Adenosine Monophosphate Synthesis in Tissues.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 28 (5): 797-802 (1967).
182. VALVERDE, I., SENER, A., LEBRUN, P., HERCHUELZ, A.,
MALAISSE, W.J.:
The Stimulus-Secretion Coupling of Glucose-Induced In-
sulin Release. XLVII. The Possible Role of Calmodulin.
Endocrinology 108 (4): 1305-1312 (1981).
183. VALVERDE, I., VANDERMEERS, A., ANJANEYULU, R.,
MALAISSE, W.J.:
Calmodulin Activation of Adenylate Cyclase in Pancreatic
Islets.
Science 206 (4415): 225-227 (1980).
184. VANE, J.R.:
Inhibitors of Prostaglandin, Prostacyclin, and Thrombo-
xane Synthesis.
Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research 4: 27
(1978).
185. VARGAFTING, B.B., DAO HAI, N.:
Selective Inhibition by Mepacrine of the Release of
"Rabbit Aorta Contracting Substance" evoked by the
Administration of Bradykinin.
J. Pharm. Pharmac. 24: 159-161 (1972).
186. WATKINS, D., COOPERSTEIN, S.J., LAZAROW, A.:
Stimulation of Insulin Secretion by Pyridine Nucleotides.
Endocrinology 88: 1380-1384 (1971).

187. WEBER, P.C., SCHERER, B., LARSSON, C.:
Increase of Free Arachidonic Acid by Furosemide in Man
as the Cause of Prostaglandin and Renin Release.
Europ. J. Pharmacol. 41: 329-332 (1977).
188. WEISENBERG, R.C.:
Microtubule Formation In Vitro in Solutions Containing
Low Calcium Concentrations.
Science 177: 1104-1105 (1972).
189. WOLLHEIM, C.B., BLONDEL, B., TRUEHEART, P.A., RENOLD, A.E.,
SHARP, G.W.G.:
Calcium-Induced Insulin Release in Monolayer Culture of
the Endocrine Pancreas. Studies with the Ionophore
A23187.
J. Biol. Chem. 250 (4): 1354-1360 (1975).
190. WOLLHEIM, C.B., KIKUCHI, M., RENOLD, A.E., SHARP, G.W.G.:
Somatostatin- and Epinephrine-Induced Modifications of
 $^{45}\text{Ca}^{++}$ Fluxes and Insulin Release in Rat Pancreatic
Islets Maintained in Tissue Culture.
J. Clin. Invest. 60: 1165-1173 (1977).
191. WOLLHEIM, C.B., KIKUCHI, M., RENOLD, A.E., SHARP, G.W.G.:
The Role of Intracellular and Extracellular Ca^{++} in
Glucose-Stimulated Biphasic Insulin Release by Rat Is-
lets.
J. Clin. Invest. 62: 451-458 (1978).
192. WOLLHEIM, C.B., SIEGEL, E.G., KIKUCHI, M., RENOLD, A.E.,
SHARP, G.W.G.:
The Role of Extracellular Ca^{2+} and Islet Calcium Stores
in the Regulation of Biphasic Insulin Release.
Horm. Metab. Res., Supplement Series No. 10: 108-115
(1980).

193. WOLTERS, G.H.J., PASMA, A., WIEGMAN, J.B., KONIJNENDIJK, W.:
Glucose-Induced Changes in Histochemically Determined
 Ca^{2+} in B-Cell Granules, ^{45}Ca Uptake, and Total Ca^{2+} of
Rat Pancreatic Islets.
Diabetes 33 (5): 409-414 (1984).
194. WOLTERS, G.H.J., WIEGMAN, J.B., KONIJNENDIJK, W.:
The Effect of Glucose Stimulation on ^{45}Ca Calcium Uptake
of Rat Pancreatic Islets and their Total Calcium Content
as Measured by a Fluorometric Micro-Method.
Diabetologia 22: 122-127 (1982).
195. WOLTERS, H.H.J., WIEGMAN, J.B., KONIJNENIJK, W.:
Effect of Glucose Stimulation on ^{45}Ca Calcium Uptake and
Total Calcium Content of Pancreatic Islets of Fed and
Fasted Rats and Obese Hyperglycemic Mice.
Diabetes 32 (2): 124-129 (1983).
196. YAMAGUCHI, I., AKIMOTO, Y., NAKAJIMA, H., KIYOTO, A.:
Effect of Diltiazem on Insulin Secretion. I, Experiments
In Vitro.
JPN. J. Pharmacol. 27 (5): 679-687 (1978).
197. YAMAMOTO, S., ISHII, M., NAKADATE, T., NAKAKI, T., KATO, R.:
Modulation of Insulin Secretion by Lipoxygenase Pro-
ducts of Arachidonic Acid.
Relation to Lipoxygenase Activity of Pancreatic Islets.
J. Biol. Chem. 258 (20): 12149-12152 (1983).
198. ZAWALICH, W.S.:
Intermediary Metabolism and Insulin Secretion from
Isolated Rat Islets of Langerhans.
Diabetes 28 (3): 252-259 (1979).
199. ZAWALICH, W.S., DYE, E.S., MATSCHINSKY, F.M.:
Metabolism and Insulin Release in Capabilities of Gluco-
samine and N-Acetylglucosamine in Isolated Rat Islets.
Biochem. J. 180: 145-152 (1979).

200. ZAWALICH, W.S., DYE, E.S., ROGNSTAD, R., MATSCHINSKY, F.M.:
On the Biochemical Nature of Triose- and Hexose-Stimu-
lated Insulin Secretion.
Endocrinology 103 (6): 2027-2034 (1978).
201. ZAWALICH, W.S., KARL, R.C., FERRENDELLI, J.A.,
MATSCHINSKY, F.M.:
Factors Governing Glucose Induced Elevation of Cyclic
3',5'-AMP Levels in Pancreatic Islets.
Diabetologia 11: 231-235 (1975).
202. ZUSMAN, R.M., KEISER, H.R.:
Prostaglandin E₂ Biosynthesis by Rabbit Renomedullary
Interstitial Cells in Tissue Culture.
J. Biol. Chem. 252 (6): 2069-2071 (1977).

DANKSAGUNG

Sehr herzlich danken möchte ich an dieser Stelle Herrn Professor Dr. med. R. Landgraf zum einen für die Überlassung des Themas und die instruktive, verständnisvolle Betreuung und zum anderen für die Korrektur dieser Arbeit.

Für die jederzeit fruchtbaren und kritischen Anregungen danke ich Frau Dr.med. M.M.C. Landgraf-Leurs.

Frau Beranek und Herrn Dr.med. König bin ich dankbar für die Anleitung zur statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Mein besonderer Dank gilt Frau S. Kammerer für ihre Hilfsbereitschaft und praktischen Ratschläge bei der Durchführung der Experimente.

Ansonsten möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

LEBENS LAUF

Am 29. November 1955 wurde ich, RUDOLF RIEPL, als zweites von vier Kindern des Maurermeisters Lorenz Riepl und seiner Ehefrau Mathilde Riepl, geb. Ziegler, in München geboren.

Von 1962 bis 1965 besuchte ich die Volksschule in Hörlkofen und danach für zwei Jahre das Volksschulinternat Ramsau bei Haag, von wo ich 1967 in das Gymnasium Erding überwechselte. Im Rahmen der reformierten Oberstufe legte ich im Juni 1976 dort die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1976 und im Sommersemester 1977 studierte ich das Fach Chemie an der Technischen Universität München.

Daraufhin absolvierte ich von August bis Oktober 1977 einen Teil des Wehrdienstes, von dem ich dann für das Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians Universität München ab dem Wintersemester 1977 freigestellt wurde. Im Anschluß an die Ärztliche Vorprüfung im August 1979 folgte der klinische Teil der Ausbildung, der mit dem dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung im Frühjahr 1984 und der Aushändigung der Approbation als Arzt seinen Abschluß fand. Seit dem 3. September 1984 leiste ich die Restgrundwehrdienstzeit von 12 Monaten als Stabsarzt ab.

